

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der Universität München

Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. G. Riethmüller

**Die Wirkung von Adriamycin auf das
Fibrosarkom AT 24
und das Adenokarzinom 284 der Maus:
Zusammenhang zwischen
Zellinaktivierungsrate und
makroskopischer Wachstumsverzögerung**

Helmut Peter Krog

München 1986



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554629_0019

Aus dem Strahlenbiologischen Institut
der Universität München

Kommissarischer Leiter: Prof.Dr.G. Riethmüller

Die Wirkung von Adriamycin auf das Fibrosarkom AT 24
und das Adenokarzinom 284 der Maus:
Zusammenhang zwischen Zellinaktivierungsrate und
makroskopischer Wachstumsverzögerung

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Helmut Peter Krog
aus Bad Wiessee

München 1986

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. K. R. Trott
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. G. Riethmüller Prof. Dr. W. Wilmanns
Dekan:	Prof. Dr. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	04.12.1986

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. J. Kummermehr und Herrn Prof. Dr. K. R. Trott für ihre intensive Betreuung und Hilfe.

Ebenso danke ich Frau Pfeiffer, sowie allen Mitarbeitern des Institutes für Strahlenbiologie für ihre Hilfe bei der praktischen Durchführung der Versuche.

Gewidmet meiner Frau Marieluise

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	3
2.1 Versuchstiere	3
2.2 Tumoren	3
2.3 Transplantation der Tumoren	4
2.3.1 Stückchentransplantation	4
2.3.2 Quantitative Transplantation von Tumorzellen	4
2.4 Messung der Tumorgröße	4
2.5 Graphische Auswertung der Größensmessungen	7
2.6 Behandlung der Tumoren	9
2.7 Histologie und Autoradiographie	9
2.8 Versuchsaufbau	11
3. Ergebnisse	13
3.1 Wachstumsverzögerung in vivo	13
3.1.1 Wachstum unbehandelter Tumoren	13
3.1.2 Einzeitbehandlung mit Adriamycin	15
3.1.3 Fraktionierte Behandlung des Fibrosarkoms mit Adriamycin	22
3.2 Quantitative Transplantation von Tumorzellen	23
3.2.1 Angehrate von Zellen aus unbehandelten und behandelten Tumoren	23
3.2.2 Wachstum und Latenzzeit der erzeugten Tumoren	27
3.2.3 ADR-Empfindlichkeit von Tumoren aus vorbehandelten Tumorzellen	31
3.3 Histologische Untersuchung	33

	Seite
3.3.1 Morphologische und morphometrische Auswertung akuter Behandlungseffekte	33
3.3.2 Markierungsindex	35
4. Diskussion	36
4.1 Ableitung der zellulären Überlebensrate aus den Ergebnissen der quantitativen Transplantation von Tumorzellen	36
4.1.1 Repräsentativität der Tumorzell- suspensionen bei der quantitativen Tumorzelltransplantation	37
4.1.2 Zellüberlebenskurve nach ADR-Behandlung	39
4.1.3 Rückschlüsse aus der Latenzzeit bei der quantitativen Transplantation	42
4.1.4 Intrazelluläre ADR-Konzentration in Adenokarzinom und Fibrosarkom	43
4.2 Wachstumsverzögerung von Tumoren durch ADR-Behandlung in vivo	44
4.2.1 Überlegungen zur Meßmethode	44
4.2.2 Begründung des doppelten Behandlungs- gewichts als Parameter für die Wachs- tumsverzögerung von Tumoren in vivo	46
4.2.3 Hypothetische Dosiswirkungskurven der Wachstumsverzögerung von Tumoren in vivo	48
4.2.4 Experimentelle Dosiswirkungsbeziehung der Wachstumsverzögerung von Fibrosarkom und Adenokarzinom	53
4.2.5 Vergleich mit der Dosiseffektkurve der Wachstumsverzögerung bei Strahlenbe- handlung	54
5. Zusammenfassung	58
6. Literaturverzeichnis	60

1. Einleitung

Bei der klinischen Behandlung fortgeschrittener Tumorerleiden hat seit 1950 neben der Strahlentherapie die Chemotherapie zunehmend an Bedeutung gewonnen. Mitte der sechziger Jahre, als bekannte Mittel aus der Reihe der Alkylantien wie Busulfan, Cyclophosphamid und Chlorambucil, oder der Antimetabolite wie Methotrexat, 6-Mercaptopurin und Fluoruracil längst in Gebrauch waren, gelang es, aus Kulturen von *Streptomyces peucetius varus caesius* eine zytostatisch wirkende, dem bereits 1965 klinisch eingesetzten Daunorubicin verwandte Substanz, nämlich Adriamycin zu gewinnen, die klinisch erstmals 1969 von Bonadonna (3) erprobt wurde. Inzwischen wird Adriamycin (ADR) klinisch routinemäßig zur Behandlung von M.Hodgkin, Tumoren des blutbildenden Knochenmarks, des Ewingsarkoms etc. eingesetzt. Außerdem gewinnt es auch in Kombination mit anderen Zytostatika zunehmend an Bedeutung, z.B. beim Mammakarzinom, Bronchialkarzinom u.a. Eine Wirkungssteigerung bei Kombination mit Bestrahlung ist umstritten (26, 19).

Nach der ersten Synthese von Adriamycin wurde eine Vielzahl von tierexperimentellen und in vitro Untersuchungen durchgeführt (5). So bestehen heute recht weitreichende Erkenntnisse über Toxizität, den Wirkungsmechanismus und die Pharmakokinetik von ADR (20). Außerdem existieren zahlreiche empirische Klinikstudien über die Erprobung verschiedener Behandlungsschemata.

Trotzdem sind noch viele Fragen der tumorbiologischen Wirkung von ADR, vor allem was Zellinaktivierung in vivo bei verschiedenen Tumoren betrifft, offengeblieben. Da die experimentellen Möglichkeiten an menschlichen Tumoren natürlicherweise sehr begrenzt sind und die aus der Klinik gewonnenen Erfahrungen aufgrund der

dabei auftretenden vielfältigen Variablen keine präzisen Rückschlüsse auf evtl. allgemeingültige Regeln zulassen, muß am Tierexperiment unter weitgehend standardisierten Bedingungen versucht werden, neue Kenntnisse dazuzugewinnen.

In dieser Arbeit werden an zwei experimentellen Tumoren der Maus die Wirkung von ADR auf das makroskopische Wachstumsverhalten sowie auf die zelluläre Inaktivierung in vivo untersucht und die Ergebnisse der beiden Ansätze verglichen. Die makroskopische Reaktion des Tumors auf ADR kann damit durch die Wirkung auf die komplexe Zellpopulation interpretiert werden.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden an weiblichen Mäusen vom Stamm C3H und männlichen Albinomäusen vom Stamm NMRI durchgeführt, zwei ingezüchteten Tierstämmen, die von der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung (GSF) zur Verfügung gestellt wurden. Die Tiere wurden zu je 10 Stück in Käfigen gehalten. Als Nahrung erhielten sie Standardfutter Altromin und Wasser ad libitum. Am Transplantationstag hatten sie ein Alter von 8 bis 10 Wochen.

2.2 Tumoren

Verwendet wurden zwei verschiedene transplantable Tumorsysteme, die für die verwendeten Tierstämme isogen waren.

Das Fibrosarkom AT 24 war als Tumor der Haut nach lokaler Bestrahlung mit 50 Gy im thorakalen Bereich einer NMRI-Maus (Neuherberg) entstanden.

Histologisch handelt es sich um ein zellreiches spindelezelliges Fibrosarkom mit faszikulär verwobener Struktur, geringfügiger Faserbildung und mäßiger Kernpolymorphie.

Das Adenokarzinom 284 ist ein vor über 15 Jahren auf einer C3H-Maus spontan entstandenes Mammakarzinom. Seither wurde es über mindestens 200 Generationen transplantiert.

Es handelt sich um ein Adenokarzinom mit gut differenzierter azinärer Struktur und zartem Stroma. Details über die Proliferationskinetik des Tumors wurden eingehend von Szczepanski und Trott beschrieben(25).

2.3 Transplantation der Tumoren

2.3.1 Stückchentransplantation

Für Untersuchungen der Wachstumsverzögerung in vivo wurde die übliche Routinemethode der Transplantation verwendet. Den Empfängertieren wurden hierbei Tumorfragmente nach folgendem Verfahren implantiert:

Die Spendermäuse mit subkutan gelegenen Tumoren von 200 bis 300 mg wurden mit Aether getötet. Der Tumor wurde sofort nach Todeseintritt herauspräpariert und mit einer Rasierklinge in würfelförmige Stückchen von etwa 1 mm Kantenlänge zerteilt, wobei nur makroskopisch vital erscheinende Gewebsanteile verwendet wurden. Die Stückchen wurden in isotone Kochsalzlösung gelegt und dann mit einer Flügelkanüle den mit Aether narkotisierten Empfängertieren subkutan an der rechten Thoraxseite implantiert. Zwischen dem Tod der Spendertiere und der Implantation verstrichen maximal 60 Minuten.

2.3.2 Quantitative Transplantation von Tumorzellen

Zur quantitativen Überimpfung von Tumorzellen (sogenanntes endpoint dilution assay) wurde aus jeweils 200 bis 300 mg großen Tumoren eine Einzelzellsuspension hergestellt. Die Präparation erfolgte für Karzinome und Sarkome nach dem gleichen, von Reinhold(14) angegebenen Verfahren.

Die von Stroma und nekrotischen Gewebsanteilen gesäuberten Tumoren wurden gewogen und mit einer Doppelklinge zerkleinert. Die erhaltene Tumormasse wurde etwa im Verhältnis 1:20 mit Trypsinlösung (0,25% in gepufferter

Phosphatlösung) versetzt 20 Minuten lang mit einem rotierenden Rasiermesser weiter aufgelöst. Danach wurde durch mehrschichtige Gaze filtriert, das Filtrat in Eiswasser gekühlt, während die zurückbleibenden Gewebestückchen in frischer Trypsinlösung weitere 20 Minuten inkubiert wurden. Die nach Filtration verbleibenden Tumorstücke wurden erneut mit Trypsinlösung versetzt und die Suspension nach 20 Minuten ein letztes Mal filtriert. Das gesammelte Filtrat wurde durch 10minütiges Zentrifugieren bei 1000 rpm eingengt. Die mikroskopische Kontrolle zeigte keine Zellaggregate. Die Konzentration der erhaltenen Einzelzellsuspension wurde in der Zählkammer ermittelt, wobei durch Eosinfärbung nicht vitale Zellen von vitalen unterschieden wurden. Die Suspensionen wurden nun durch entsprechende Verdünnung auf Konzentrationen eingestellt, die in 0,05 ml die gewünschte Zahl vitaler Zellen einer Einzelinjektion enthielt. Daneben wurde eine einheitliche Feederzellsuspension mit einer Konzentration von $10^6/0,05$ hergestellt. Diese vorher durch eine Dosis von 50 Gy 60 Co-Strahlung inaktivierte Feederzellsuspension wurde im Volumenverhältnis 1:1 mit den Vitalzellsuspensionen vermischt. Dieses Verfahren erhöht die Angehewahrscheinlichkeit der klonogenen Zellen (16, 23).

Von der erhaltenen Mischzellsuspension wurden letztlich jedem Tier 0,1 ml injiziert, Fibrosarkomzellen intramuskulär in den rechten Oberschenkel, Adenokarzinomzellen subkutan in die rechte Thoraxseite der Empfängertiere.

Bei den Versuchen wurden für jede Dosisgruppe (Adriamycindosis der Spendertiere) 5, manchmal auch 6 Kohorten von je 10 Mäusen gebildet. Die Tiere einer Kohorte erhielten jeweils dieselbe Zellzahl, wobei die verimpften Zellzahlen sich in absteigender Reihe jeweils um

den Faktor 4 voneinander unterschieden. So wurden in jeder Dosisgruppe Zellzahlen in einer Breite von 4^5 untersucht, z.B. 1, 4, 16, 64 und 256 Zellen. Für jede Kohorte wurde die Angehrate der Tumoren festgestellt. Aus den Werten sämtlicher Kohorten einer Dosisgruppe wurde nach dem Verfahren von Finney(9) die TD 50 ermittelt, d.h., diejenige Zellzahl, bei der die Angehrate 50 % beträgt. Finney geht bei seinem Ansatz davon aus, daß die Beziehung zwischen Angehewahrscheinlichkeit und Anzahl verimpfter klonogener Zellen durch eine Poisson-Verteilungsfunktion bestimmt ist.

2.4 Messung der Tumorgröße

Frühestens 8 Tage nach subkutaner Implantation von Tumorstückchen, bzw. Injektion von Tumorzellsuspensionen (Adenokarzinom 284) wurde ein kleines Tumorknötchen subkutan palpabel. Bis dieses ein Gewicht von ca. 30 mg erreicht hatte, wurde seine Größe durch Palpation geschätzt. Das weitere Größenwachstum wurde nach einem von Steel(22) angegebenen Verfahren mit einer Plexiglasschablone gemessen, die eine Reihe kreisrunder Bohrungen mit steigendem Durchmesser enthielt.

Jeder Bohrung war auf Grund vorangegangener Eichmessungen (Größenmessung in situ und nachfolgende Exzision und Wägung) eine bestimmte Tumormasse zugeordnet, so daß die Größe letztlich als Gewicht (in mg) ausgedrückt wird. Die Tumorgröße wurde durch Aufsuchen des Bohrloches ermittelt, das den gut verschieblichen Tumor mit umgebender Haut eben noch aufnahm. Bei intramuskulärer Transplantation von Tumorzellen (Fibrosarkom AT 24) wurde eine eher diffuse Schwellung des rechten Oberschenkels beobachtet. Das Tumorgewicht konnte in diesem Fall durch den palpatorischen Vergleich mit der Größe

der subkutan gewachsenen Tumoren nur grob geschätzt werden. Die Größenerfassung der Tumoren erfolgte jeden zweiten Tag.

Nach dem Erreichen eines Tumorgewichts von mindestens 600 mg wurden die Trägartiere abgetötet, subkutane Tumoren herauspräpariert und gewogen. Die beobachteten Unterschiede zwischen Wägung und Messung werden in Abschnitt 4.2.1 besprochen. Eine Präparation und Wägung der nach intramuskulärer Transplantation gewachsenen Tumoren war nicht möglich.

2.5 Graphische Auswertung der Größenmessungen

Die mit der Schablone gemessenen Tumorgößen wurden gegen die Zeit nach Transplantation aufgetragen. Für jeden Tumor wurde hieraus eine individuelle Wachstumskurve erstellt.

Um die Wachstumskurven aus verschiedenen Versuchsgruppen miteinander vergleichen zu können, wurden die Wachstumskurven von Tieren derselben Gruppe gemittelt.

Zu diesem Zweck wurden sie auf einen Tag Null normiert, an welchem die Tumoren eine Größe zwischen 80 mg und 170 mg, entsprechend dem Behandlungsgewicht, erreicht hatten. Dies bedeutet eine Verschiebung der individuellen Wachstumskurven auf der Zeitachse (Abszisse). Durch randomisiertes Auffüllen der Dosisgruppen unterschieden sich die gemittelten Latenzzeiten zum Erreichen des Behandlungsgewichts in den verschiedenen Behandlungsgruppen maximal um 1 Tag vom Mittelwert der Kontrollgruppe.

In einem weiteren Normierungsschritt wurden die Kurven am Tag Null auf ein Tumorgewicht von 100 mg normiert,

was einer Verschiebung auf der Gewichtsachse (Ordinate) entspricht.

In Versuchsgruppen, in denen die Tumoren nach Behandlung mit Adriamycin zunächst eine Regression bzw. Remission durchliefen, wurden in dieser Phase wie üblich die Tumorgewichte gemittelt und als Funktion der Zeit nach Behandlung dargestellt. Hierbei ergeben sich senkrechte Irrtumsbalken.

Bei progressivem Wachstumsverhalten einer Versuchsgruppe - in der Rezidivphase bzw. bei niedriger Dosierung von Anfang an - wurden die Latenzzeiten gemittelt, die die Tumoren vom Behandlungstermin an zum Erreichen einer bestimmten Größe benötigt hatten. Die zugehörigen Irrtumsbalken sind naturgemäß horizontal.

Manche Kurven sind dementsprechend in zwei Abschnitte geteilt. In der Phase der Regression waren sie durch Mittelung der Tumorgewichte bezogen auf die Zeit nach Behandlung, bei Übergang in progressives Rezidivwachstum durch die Latenzzeiten zum Erreichen einer vorgegebenen Tumorgröße definiert. Das Kurvenstück am Übergang - in den Abbildungen kenntlich durch den Wechsel von vertikalen auf horizontale Irrtumsbalken - ist demnach nicht definiert.

Untersuchungen an einer großen Zahl gleich behandelter Transplantattumoren haben gezeigt, daß die Latenzzeiten im allgemeinen eher log-normal verteilt als normalverteilt sind(17). Daher wurde für jede Gruppe der geometrische Mittelwert und dessen mittlerer Fehler berechnet. Die Fehlergrenzen für den Mittelwert sind in der log-normal-Verteilung definiert als: $X \cdot S.E.$ und $X/S.E.$ bzw. $\ln X \pm \ln S.E.$ Diese Werte sind in Tab. 3.5 für alle Versuchsgruppen zusammengestellt.

2.6 Behandlung der Tumoren

Den zu behandelnden mit Äther narkotisierten Tieren wurde intraperitoneal das Zytostatikum Adriamycin (ADR) injiziert in der Konzentration zwischen 0,5 mg/ml und 2 mg/ml. Das zu verabreichende Volumen wurde für jedes einzelne Tier auf das Körpergewicht bezogen (Dosierungen siehe S. 11).

Für die Untersuchung der Wachstumsverzögerung in vivo wurden relativ einheitliche Tumorgrößen festgelegt. Beim Fibrosarkom lagen sie zwischen 80 und 125 mg, beim Adenokarzinom zwischen 80 und 170 mg. Für die quantitative Transplantation wurden beide Tumoren in einer Größe zwischen 80 und 250 mg behandelt und 24 bzw. 48 h nach Behandlung zur Herstellung der Suspension entnommen.

2.7 Histologie und Autoradiographie

Unbehandelte und behandelte Spendertumoren für Zellsuspensionen wurden zum Teil histologisch und autoradiographisch untersucht.

Hierzu wurde mit der Rasierklinge eine etwa 1 mm dicke Scheibe aus der Äquatorialebene des Tumors entnommen. Das Material wurde in Methacrylat eingebettet und in 3µ-Schnitte aufgearbeitet.

Zur Untersuchung der Zellproliferation wurde den Tieren 1 Stunde vor Abtötung tritiiertes Thymidin (Firma Buchler in Braunschweig, ^3H -TdR, 2µCi/g Körpergewicht, spezifische Aktivität 5mCi/mmol) intraperitoneal injiziert. ^3H -TdR wird von den proliferierenden Zellen für die DNS-Synthese als Baustein verwendet, also während

der Verfügbarkeitszeit in alle in S-Phase befindlichen Zellkerne eingebaut. Diese radioaktive Markierung kann im histologischen Schnitt nach Beschichtung mit einer Filmemulsion sichtbar gemacht werden. Die mit Kodak NTB 2 Emulsion beschichteten Schnitte wurden für 3 Wochen im Kühlschrank bei 4°C exponiert, dann entwickelt und mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Für die mikroskopische Auszählung wurde eine Okularplatte mit Zählstrich verwendet. Unter mäanderförmiger Führung des Gesichtsfeldes durch den Tumor wurden alle auf der Linie befindlichen Zellkerne ausgewertet. Der Anteil der an der Filmschwärzung erkennbaren radioaktiv markierten Zellen an der Gesamtzahl geschnittener Kerne ergibt den Markierungsindex.

Daneben wurden die histologischen Präparate auch morphometrisch untersucht. Dazu wurden die in den Schnitten sichtbaren Strukturen klassifiziert in

1. Tumorzellkerne
2. Tumorzellplasma
3. Stroma
4. Zellnekrosen

Als Stroma wurden Bindegewebs- und Gefäßstrukturen bezeichnet. Nekrosezonen waren charakterisiert als aufgehellte verwaschene Gewebsgebiete mit Zellkernen, die anhand von Hyperchromasie und Schrumpfung mit großer Sicherheit als pyknotisch angesehen werden konnten.

Für die morphometrische Erfassung wurde eine Okularplatte verwendet, auf der 25 Schnittpunkte gleichmäßig über das Gesichtsfeld verteilt waren. Diese Punkte wurden entsprechend ihrer Lage auf Zellkern, Plasma etc. den genannten Kategorien zugeordnet. Hieraus ergaben sich die relativen Anteile von Zellkernen, Zellplasma, Stroma und Nekrosen.

2.8 Versuchsaufbau

Wachstumsverzögerung von Tumoren

Versuchsgruppe	ADR-Dosis [mg/kg]	n Tiere
A. Unbehandelte Kontrollgruppe		
1. Fibrosarkom	0	23
2. Adenokarzinom	0	8
B. ADR-Einzeitdosenbehandlung		
1. Fibrosarkom	3	16
	6	18
	10	18
	15	20
	20	9
2. Adenokarzinom		
	5	5
	7,5	10
	10	6
	15	10
C. Dosisfraktionierung beim Fibrosarkom		
Abstand 1d	2 x 7,5	15
Abstand 2d	2 x 7,5	19
Abstand 3d	2 x 7,5	16
Abstand 4d	2 x 7,5	12
D. ADR-Empfindlichkeit von Adenokarzinomen aus vorbehandelten Tumorzellen		
	15	6

Quantitative Transplantation von Tumorzellen

Dosisgruppe ADR [mg/kg]	Zeit zwischen Behandlung und Tumorent- nahme	Verimpfte Zellzahlen	n Tiere
Fibrosarkom			
0	1d	1, 4, 1024	60
0	1d	4, 16 1024	50
20	1d	312, 1248 319488	60
20	1d	4, 16, 1024	50
20	2d	4, 16, 1024	50
40	1d	50, 200, 12800	50
Adenokarzinom			
0	1d	4, 16, 4096	60
10	1d	25, 100, 6400	50
10	1d	50, 200, 12800	50
20	1d	63, 252, 16064	50
20	1d	390, 1560, 99840	50
30	1d	200, 800, 51200	50
40	1d	625, 2500, 160000	50
50	1d	1200, 4800, 307200	50

3 . Ergebnisse

3.1 Wachstumsverzögerung in vivo

3.1.1 Wachstum unbehandelter Tumoren

Abb. 3.1 zeigt die individuellen Wachstumskurven von zufällig ausgewählten unbehandelten Tumoren des Adenokarzinoms 284. Derartige Kurvenscharen wurden mit dem in Abschnitt 2.5 beschriebenen Verfahren zu jeweils einer Mittelwertskurve zusammengefaßt. Die Kurvenpunkte stellen geometrische Mittelwerte der Tumorgrößen bzw. Latenzzeiten mit deren mittleren Fehlern dar.

Abb. 3.2 zeigt die gemittelten Wachstumskurven für die unbehandelten Fibrosarkome und Adenokarzinome. Bei der halblogarithmischen Darstellung würde exponentielles Wachstum der Tumoren einer Geraden entsprechen, deren Neigung die Wachstumsrate wiedergibt. Es zeigt sich aber, daß die Kurven beider Tumorsysteme mit steigendem Gewicht der Tumoren zunehmend vom rein exponentiellen Verlauf nach unten abweichen, d.h. die Wachstumsraten mit zunehmendem Gewicht kleiner werden.

Dieses Verhalten läßt sich auch anhand der Tumorverdopplungszeiten demonstrieren, die in Tabelle 3.1 mit den entsprechenden Ausgangsgewichten aufgeführt sind. Die Verdopplungszeiten sind bei einem mittleren Tumorgewicht von 100 mg mit 1,48 d für Fibrosarkom und 1,31 d für Adenokarzinom annähernd gleich. Mit steigendem Tumorgewicht nimmt die Verdopplungszeit beim Fibrosarkom geringfügig zu. Ähnlich verhält es sich beim Adenokarzinom bis zu einer Tumorgröße von ca. 200 mg. Darüber zeigt das Adenokarzinom eine deutlich schnel-

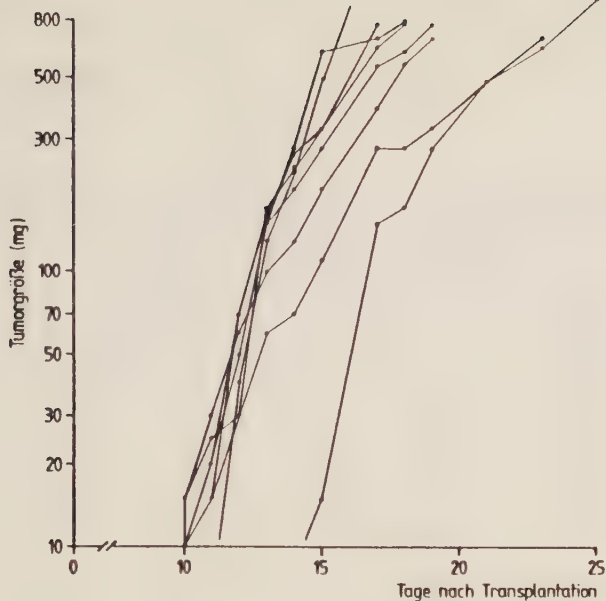


Abb. 3.1: Individuelle Wachstumskurven von 8 unbehandelten Tumoren des Adenokarzinoms 284

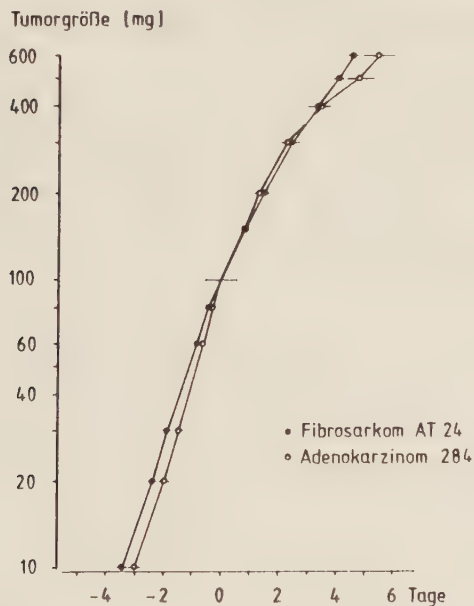


Abb. 3.2: Gemittelte Wachstumskurven der unbehandelten Kontrollgruppen von Fibrosarkom (●) und Adenokarzinom (○). Die Tumoren mit einem Gewicht zwischen 80 mg und 170 mg (Behandlungsgewicht) wurden dabei auf einen Tag 0 und ein Gewicht von 100 mg normiert. Die Standardabweichung ist miteingezeichnet.

lere Abbremsung als das Fibrosarkom. Dies entspricht der deutlichen Abflachung der Adenokarzinom-Wachstumskurve bei einem Tumorgewicht von 400 mg.

Ausgangsgewicht [mg]	Zeit zur Verdopplung [d]	
	Fibrosarkom	Adenokarzinom
100	1,48	1,31
150	1,64	1,47
200	1,83	2,01
300	2,03	3,13

Tab. 3.1: Mittlere Verdopplungszeiten der unbehandelten Fibrosarkome und Adenokarzinome bei verschiedenen Ausgangsgewichten.

3.1.2 Einzeitbehandlung mit Adriamycin

Abb. 3.3 zeigt die gemittelten Wachstumskurven nach Einzeitbehandlung des Fibrosarkoms mit verschiedenen Dosen von ADR, Abb. 3.4 die entsprechenden Kurven des Adenokarzinoms. In beide Abbildungen ist zum Vergleich die Wachstumskurve der unbehandelten Tumoren jeweils miteingezeichnet.

Beim Fibrosarkom zeigt sich nach der Behandlung der Tumoren eine in Dauer und Ausmaß dosisabhängige Verkleinerung der Wachstumsrate, wie an der mit der Dosis zunehmenden Abflachung der Wachstumskurven zu erkennen ist. Nach Ablauf von maximal 4 Tagen nehmen die Kurven wieder an Steilheit zu. Eine Regression wird zu keiner Zeit beobachtet.

Die Wirkung auf den Tumor kann u.a. mit der Zeit erfaßt werden, die der Tumor braucht, um sein Behandlungsgewicht zu verdoppeln. Die Zeiten sind in Tab. 3.2 für

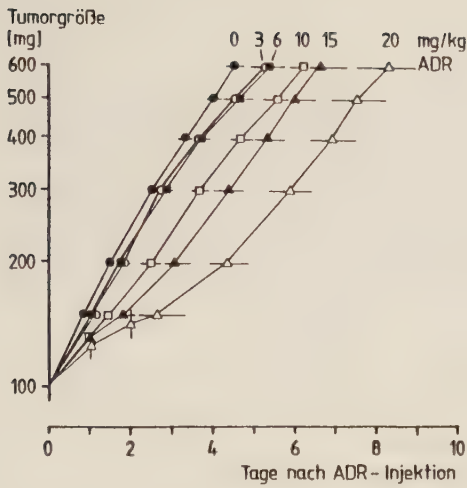


Abb. 3.3: Gemittelte Wachstumskurven von Fibrosarkom-tumoren mit zunehmenden Einzeiddosen (EZD) von ADR:

- = unbehandelte Kontrollgruppe,
- = 3 mg/kg, ■ = 6 mg/kg, □ = 10 mg/kg,
- ▲ = 15 mg/kg, △ = 20 mg/kg.

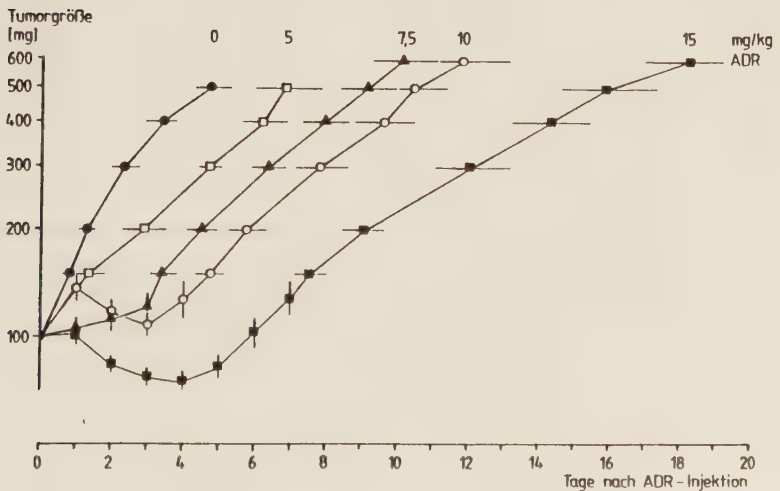


Abb. 3.4: Gemittelte Wachstumskurven von Adenokarzinom-tumoren mit zunehmenden EZD von ADR:

- = unbehandelte Kontrollgruppe,
- = 5 mg/kg, ▲ = 7,5 mg/kg, ○ = 10 mg/kg,
- = 15 mg/kg

die einzelnen Dosen aufgelistet. Der Dosisseffekt von ADR auf das Wachstum der Fibrosarkomtumoren erscheint gering. So erzielten hochtoxische (LD_{50} 18 mg/kg; Todesfälle erst ab dem 6. Tag nach Behandlung) Dosen von 15 mg/kg bzw. 20 mg/kg ADR nur Verzögerungen von 1,63 bzw. 2,86 Tagen. Bei Dosen unter 10 mg/kg beträgt die Verzögerung sogar nur noch 0,26 Tage.

ADR-Dosis [mg/kg]	T_2 [d]	Wachstums- verzögerung [d]
0	1,48	0
3	1,74	0,26
6	1,73	0,25
10	2,48	1,00
15	3,11	1,63
20	4,34	2,86

Tab. 3.2: Zeit zum Erreichen der doppelten Behandlungsgröße beim Fibrosarkom nach Behandlung mit aufsteigenden ADR-Dosen.

Ein Effekt der Behandlung auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren im weiteren Verlauf wird mit der Zeit erfaßt, die der Tumor braucht, sein doppeltes Behandlungsgewicht wiederum zu verdoppeln. Die entsprechenden Verdopplungszeiten (T_2/T_4) sind beim Fibrosarkom in den verschiedenen Dosisgruppen nur geringfügig größer (2,55 d bei 20 mg/kg ADR) als die der Kontrollen (1,83 d), d.h. ADR hat neben einem temporären, schwach dosisabhängigen Effekt auf das endgültige Wachstumsverhalten des Fibrosarkoms kaum Einfluß.

Beim Adenokarzinom ist der initiale Größenverlauf etwas variabel. Nach 5 mg/kg ADR wird nur eine leichte Verlangsamung erreicht, nach 7,5 mg/kg nahezu eine Stagnation über 3 Tage, während nach 10 mg/kg am 1. Tag noch

eine deutliche Zunahme, gefolgt von einer Regression zum Ausgangswert, beobachtet wird. Nur nach 15 mg/kg kommt es mit eintägiger Verzögerung zu einer Schrumpfung unter die Ausgangsgröße (70 % am 4. Tag). Entscheidend ist jedoch, daß in der Phase des endgültigen Rezidivwachstums alle Kurven dosisabhängig gestaffelt sind.

Die Zeiten zum Erreichen der doppelten Tumorgroße (T_2) sind in Tab. 3.3 zusammen mit den entsprechenden Behandlungsdosen aufgeführt. Die mit ADR erzielte Wachstumsverzögerung ist hier wesentlich größer als beim Fibrosarkom. So verlängert eine Dosis von 10 mg/kg ADR die T_2 beim Fibrosarkom um 1,0 Tage, beim Adenokarzinom um 4,43 Tage, eine Dosis von 15 mg/kg ADR die T_2 beim Fibrosarkom um 1,63 Tage, beim Adenokarzinom um 7,71 Tage.

ADR-Dosis [mg/kg]	T_2 [d]	Wachstums- verzögerung [d]
0	1,31	0
5	2,78	1,47
7,5	4,49	3,18
10	5,74	4,43
15	9,02	7,71

Tab. 3.3: Zeit zum Erreichen der doppelten Behandlungsgröße beim Adenokarzinom nach Behandlung mit aufsteigenden ADR-Dosen.

Beim Adenokarzinom wird auch das weitere Wachstumsverhalten von der Behandlung beeinflusst, wie sich wiederum am besten an der Zeit ablesen läßt, die der Tumor benötigt, um vom doppelten zum vierfachen Behandlungsgewicht zu gelangen (Tab. 3.4). So nimmt die Verdopp-

auf 3,33 d in der mit 5 mg/kg ADR behandelten Gruppe zu. Bei 15 mg/kg ADR beträgt sie sogar 5,23 d.

ADR-Dosen [mg/kg]	T_2/T_4 [d]	Wachstums- verlangsamung [d]
0	2,01	0
5	3,33	1,32
7,5	3,42	1,41
10	3,82	1,81
15	5,23	3,22

Tab. 3.4: Mittlere Wachstumszeit des Adenokarzinoms vom doppelten zum vierfachen Behandlungsge-
wicht nach Behandlung mit aufsteigenden ADR-
Dosen.

In Tab. 3.5 sind für alle Versuchsgruppen die Zeiten zum Erreichen der doppelten und vierfachen Behandlungsgröße (T_2 und T_4) aufgelistet; hierbei handelt es sich um die Gesamtwachstumsdauer. Die sogenannte Wachstumsverzögerung, also Wachstumsdauer abzüglich Kontrolle, ist graphisch in Abb. 3.5 und Abb. 3.6 eingezeichnet, wobei zusätzliche Endpunkte, also Wachstumsverzögerung zum Erreichen der 1,5-fachen bis 6-fachen Behandlungsgröße aufgenommen sind. Entsprechend der geringen Wirkung von ADR auf das Wachstumsverhalten des Fibrosarkoms ist dessen Kurve wesentlich flacher als die des sensibleren Adenokarzinoms. Beide Kurven verlaufen annähernd linear.

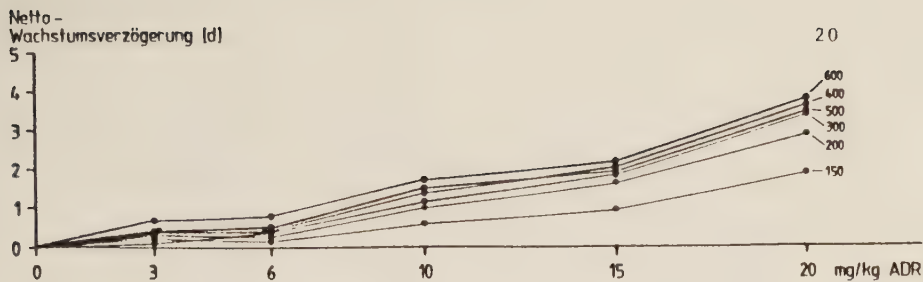


Abb. 3.5: Dosiswirkungskurven beim Fibrosarkom, aufgetragen sind aufsteigende Einzeildosen von ADR gegen die Wachstumsverzögerung in Tagen zum Erreichen von 150 mg, 200 mg, 300 mg, 400 mg, 500 mg und 600 mg.

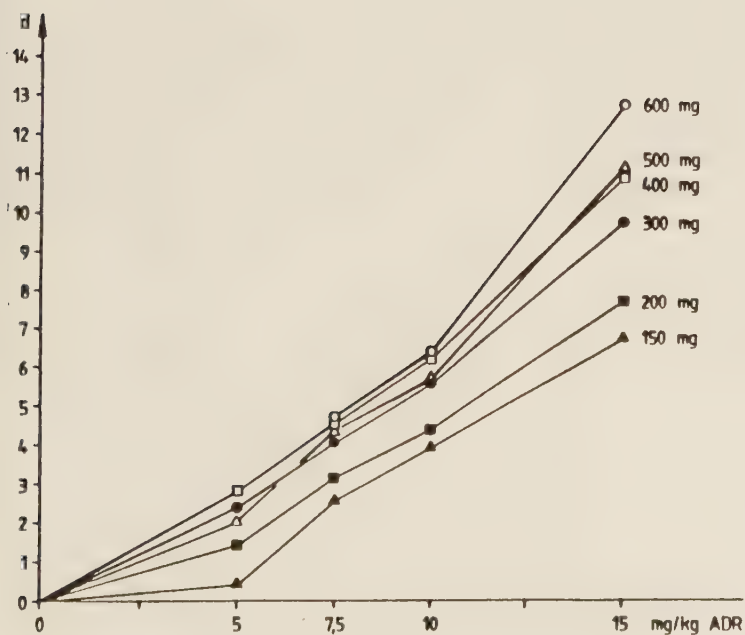


Abb. 3.6: Dosiswirkungskurven beim Adenokarzinom, aufgetragen sind aufsteigende EZD von ADR gegen die Wachstumsverzögerung in d zum Erreichen von $\blacktriangle$ = 150 mg, $\blacksquare$ = 200 mg, $\bullet$ = 300 mg, $\square$ = 400 mg, $\triangle$ = 500 mg und $\circ$ = 600 mg.

n Tiere	ADR-Dosis mg/kg	Behandlungsschema	T ₂ = Verdopplungszeit	T ₄ = Vervierfachsungszeit
Fibrosarkom				
23	0	EZB	1,48 (1,38.....1,59)	3,31 (3,14.....3,49)
16	3	EZB	1,74 (1,55.....1,94)	3,66 (3,40.....3,93)
18	6	EZB	1,73 (1,59.....1,87)	3,68 (3,44.....3,95)
18	10	EZB	2,48 (2,26.....2,71)	4,68 (4,42.....4,95)
20	15	EZB	3,44 (3,13.....3,79)	5,76 (5,33.....6,22)
9	20	EZB	4,34 (3,92.....4,81)	6,89 (6,34.....7,48)
15	2 x 7,5	FB 1d		5,60 (5,28.....5,94)
19	2 x 7,5	FB 2d		5,38 (5,04.....5,75)
16	2 x 7,5	FB 3d		4,72 (4,33.....5,14)
12	2 x 7,5	FB 4d		4,72 (4,14.....5,37)
Adenokarzinom				
9	0	EZB	1,31 (1,12.....1,53)	3,32 (2,92.....3,78)
5	5	EZB	2,78 (2,36.....3,49)	6,11 (5,59.....6,88)
10	7,5	EZB	4,49 (4,08.....4,93)	7,91 (7,29.....8,59)
6	10	EZB	5,74 (5,23.....6,31)	9,56 (8,75.....10,45)
10	15	EZB	9,02 (8,46.....9,62)	14,25 (13,19.....15,41)

Tab. 3.5: Mittlere Verdopplungs- und Vervierfachsungszeiten beim Regrowth-Delay-Assay mit Standardabweichung (Ausdruck in Klammern).

3.1.3 Fraktionierte Behandlung des Fibrosarkoms mit Adriamycin

In diesem Versuch wurden die Versuchstiere zweimal mit einer Dosis von 7,5 mg/kg ADR behandelt, wobei Intervalle von 1, 2, 3 und 4 Tagen gewählt wurden. In Abb. 3.7 sind die gemittelten Wachstumskurven dazu erstellt. Zum Vergleich ist die Kurve einer Einzeitbehandlung mit 15 mg/kg ADR mit eingezeichnet.

Die Latenzzeiten bis zur Verdopplung sind hier zur Beurteilung der durch die fraktionierte Behandlung erzielten Verzögerung ungeeignet, da zum Zeitpunkt der Zweitbehandlung das doppelte Behandlungsgewicht oft schon überschritten war.

Aus den in Tab. 3.5 aufgeführten Latenzzeiten zum Erreichen des vierfachen Behandlungsgewichts ist ersichtlich, daß die Fraktionierung der Dosis eine durchwegs geringere Wirkung zur Folge hat als die entsprechende Einzeldosis. Die Effektivität der Behandlung nimmt mit dem Größerwerden der Behandlungsintervalle ab.

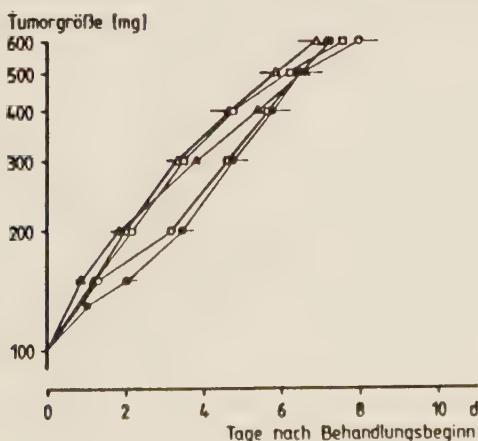


Abb. 3.7: Mittlere Wachstumskurven bei zweifacher Fraktionierung einer 15 mg/kg Dosis ADR mit einem zeitlichen Abstand von ○ = 1d, ▲ = 2d, △ = 3d und □ = 4d.
● = EZD von 15 mg/kg ADR.

3.2 Quantitative Transplantation von Tumorzellen

Bei dieser Versuchsreihe wurden, wie in Abschnitt 2.3.2 beschrieben, den Versuchstieren Suspensionen verimpft, die eine definierte Anzahl vitaler Tumorzellen enthielten. Hauptziel der Versuche mit quantitativer Zelltransplantation war die Ermittlung der Tumorangehrate bzw. der mittleren take dose, die durch das Angehen von Tumoren in 50 % der Implantationen definiert ist. Durch lückenlose Größenmessung wurden auch die Wachstumskurven erzeugter Tumoren und ihre Latenzzeit erfaßt.

3.2.1 Angehrate von Zellen aus unbehandelten und behandelten Tumoren

In Abb. 3.8 sind für das Fibrosarkom, in Abb. 3.9 für das Adenokarzinom die verimpften Zellzahlen gegen die entsprechenden Angehraten halblogarithmisch aufgetragen. Es zeigt sich die für alle Kurven dieser Art typische sigmoide Form. Die Kurven erreichen ungefähr bei 50 % Angehrate ihre größte Steigung, um sich zu 100 % Angehrate asymptotisch abzuflachen.

Mit Hilfe des statistischen Ansatzes nach Finney(9) wurde die TD 50 (Take Dose 50 %) mit asymmetrischer Standardabweichung berechnet, die einer Angehrate von 50 % entspricht. Sie liegt beim Adenokarzinom bei 70 (48.....103) Zellen. Für das Fibrosarkom ergeben sich für die beiden durchgeführten Kontrollen unterschiedlich steile Kurven, jedoch gleiche Werte für die TD 50. Sie betragen 23(16....33) Zellen, bzw. 23(14.....39) Zellen.

Sowohl beim Fibrosarkom als auch beim Adenokarzinom wurde parallel zu den beschriebenen Kontrollreihen die

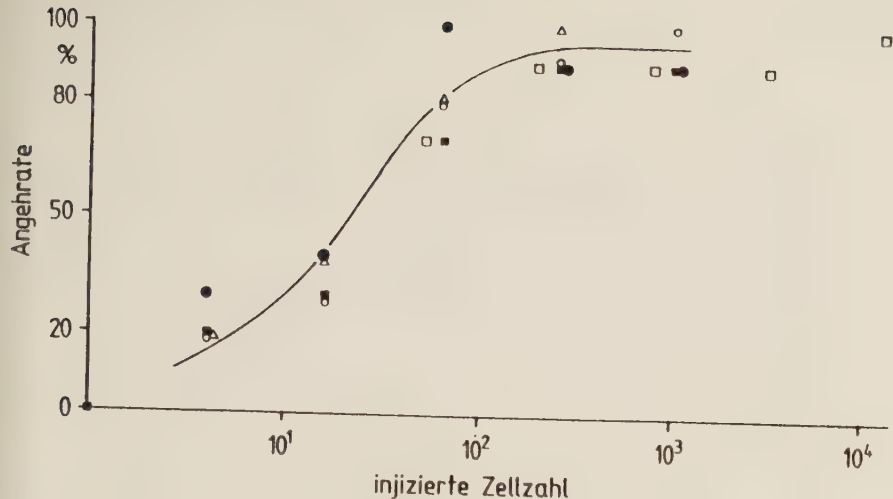


Abb. 3.8: Bei der quantitativen Transplantation von Tumorzellen des Fibrosarkoms erzielte Angehrate in % gegen die verabreichten Zellinokulagrößen nach Vorbehandlung der Spendertiere mit $\square = 40$ mg/kg, $\blacksquare \bullet$ = Kontrollen. $\circ = 20$ mg/kg, 1d, $\triangle = 20$ mg/kg, 2d vor Entnahme
Die Kurve stellt den fit für die beiden Kontrollgruppen dar.

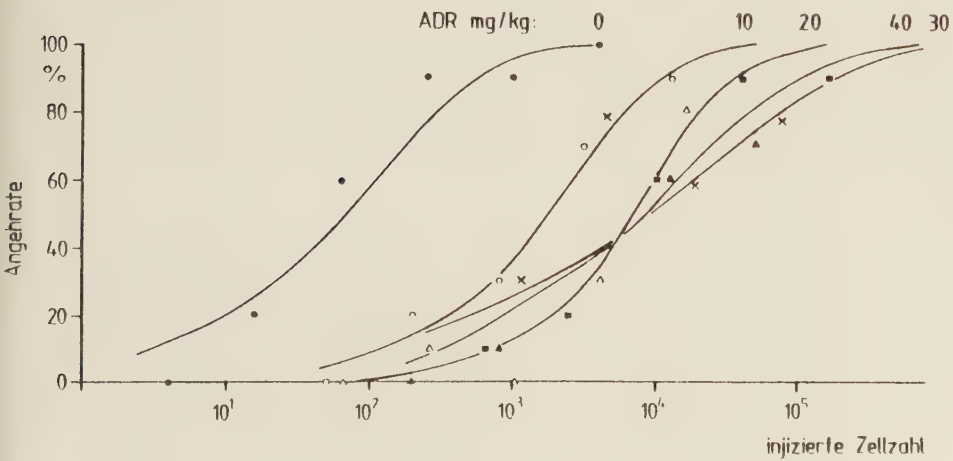


Abb. 3.9: Bei der quantitativen Transplantation von Tumorzellen des Adenokarzinoms erzielte Angehrate in % gegen die verabreichten Zellinokulagrößen nach Vorbehandlung der Spendertiere mit $\circ = 10$ mg/kg, $\triangle = 20$ mg/kg, $\blacktriangle = 30$ mg/kg, $\blacksquare = 40$ mg/kg, $\times = 50$ mg/kg (ohne Kurve), $\bullet$ = Kontrollen.

quantitative Transplantation nach verschiedenen Einzel-dosen von ADR durchgeführt. Die Entnahme der Spender-tumoren erfolgte in diesem Fall 24 h, bzw. 48 h nach ADR-Injektion. Gemäß der bei der jeweiligen Dosis zu erwartenden Zellinaktivierungsrate wurden die injizierten Zellzahlen so gewählt, daß sie die TD 50 mit aller Wahrscheinlichkeit enthielten. Die zugrundeliegende Schätzung war meistens richtig, mit Ausnahme von zwei Versuchsreihen des Fibrosarkoms, bei denen wegen einer zu hoch geschätzten TD 50 sämtliche Angehraten weit über 50 % lagen. Der Zusammenhang zwischen verimpften Zellzahlen und Angehraten in den untersuchten Dosis-gruppen ist für das Fibrosarkom in Abb. 3.8, für das Adenokarzinom in Abb. 3.9 eingezeichnet. Beim Fibrosar-kom unterscheiden sich die Kurven bezüglich Lage und Steigung nur unwesentlich; die TD 50-Werte sind nicht signifikant verschieden, zeigen also keinerlei Dosisab-hängigkeit. Die Kurven der verschiedenen Dosisgruppen beim Adenokarzinom sind denen der Kontrollen in der Ge-stalt ähnlich, sind aber im Vergleich zu den Kontrollen um so mehr zu größeren Zellzahlen verschoben, je höher die untersuchte Dosis ist. Aus den TD 50-Messungen läßt sich eine Dosis-Wirkungsbeziehung nach folgender Über-legung ableiten:

Um dieselbe Wirkung, d.h. eine 50 % Angehrate, zu er-zielen, braucht man nach Vorbehandlung mit ADR mehr Zellen als ohne Vorbehandlung. So sind z.B. beim Adeno-karzinom ca. 50 unbehandelte Zellen für die Erzeugung von Tumoren genauso effektiv wie ca. 1000 Zellen aus einem Spender, der mit 20 mg/kg ADR behandelt wurde. Da einer 50 % Angehrate definitionsgemäß eine gleiche An-zahl klonogener überlebender Zellen zugrunde liegt, lassen sich die Überlebensraten behandelter Zellen fol-gendermaßen berechnen:

$$\text{Überlebensrate} = \frac{\text{TD 50 unbehandelter Zellen}}{\text{TD 50 behandelter Zellen}}$$

In Abb. 3.10 sind für das Adenokarzinom die nach obiger Gleichung errechneten Überlebensraten gegen die Behandlungsdosis aufgetragen.

Bereits bei einer Dosis von 10 mg/kg überleben nur noch 3 % der Zellen. Nach einem deutlichen Knick in der Zellüberlebenskurve bei etwa 15 mg/kg ADR verläuft die Kurve beinahe horizontal weiter. Eine Erhöhung der ADR-Dosis über 15 mg/kg hinaus erzielt demnach beim Adenokarzinom praktisch keine Wirkungssteigerung mehr. Beim Fibrosarkom sind die Überlebensraten wesentlich größer. So nimmt die Überlebensrate bei einer Behandlungsdosis von 20 mg/kg nur auf 78,5 % ab.

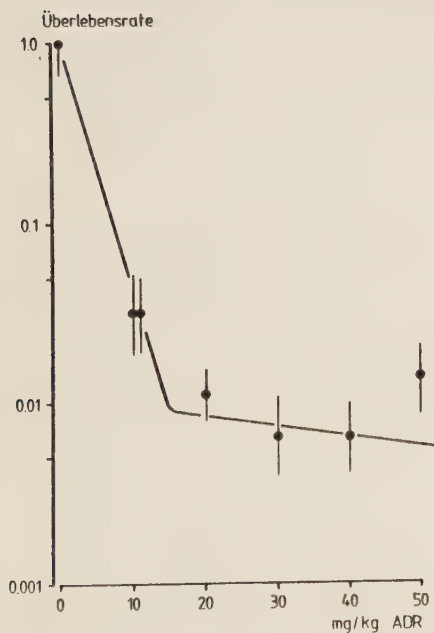


Abb. 3.10: Zelluläre Überlebensraten nach Behandlung solider Adenokarzinomtumoren mit zunehmenden EZD von ADR.

3.2.2 Wachstum und Latenzzeit der erzeugten Tumoren

Durch laufende Größenmessung (siehe 2.4) war es möglich, für die durch Verimpfung erzeugten Tumoren Wachstumskurven zu ermitteln. In Abb. 3.11 und Abb. 3.12 sind als Beispiel die Mittelwertskurven von Tumoren aufgetragen, die durch Transplantation von unbehandelten, bzw. mit 20 mg/kg ADR vorbehandelten Adenokarzinomzellen erzeugt wurden. Aufgrund der beträchtlichen Streuung der Wachstumskurven von mit der gleichen Zelldosis erzeugten Tumoren ist die Trennung der den verschiedenen Zelldosen zugehörigen Mittelwertskurven voneinander unscharf, was in beiden Abbildungen durch die breite Überschneidung der Irrtumbalken benachbarter Mittelwertskurven sichtbar wird. Die Wachstumsraten bei 100 mg Tumorgewicht nehmen sowohl bei den Kontrollen als auch bei Vorbehandlung der Spendertumoren mit 20 mg/kg ADR mit abnehmender Zahl implantierter Zellen ab, was in einer Verlängerung der Tumorverdopplungszeiten deutlich wird.

Als Latenzzeiten werden im vorliegenden Fall die von der Verimpfung der Tumorzellen an zum Erreichen einer Größe von 100 mg benötigten Zeitspannen gewählt. Dabei zeigt sich mit Abnehmen der den Wachstumskurven zugrundeliegenden Zellzahldosen ein Größerwerden der entsprechenden Latenzzeiten. Die Latenzzeitunterschiede zwischen den verschiedenen Zellzahlstufen schwanken zum Teil beträchtlich. Im Mittel verkürzt sich die Latenzzeit durch Erhöhung der verimpften Zellzahl um den Faktor 4 bei den Kontrollen durchschnittlich um 2,48 Tage, bei Vorbehandlung der Spendertumoren mit 20 mg/kg ADR um 2,18 Tage. Da in dieser Zeitspanne die verimpfte Zellzahl um den Faktor 4 zunimmt, müßte die subklinische Tumorverdopplungszeit die Hälfte betragen, und zwar 1,24 Tage bei den Kontrollen, bzw. 1,09 Tage

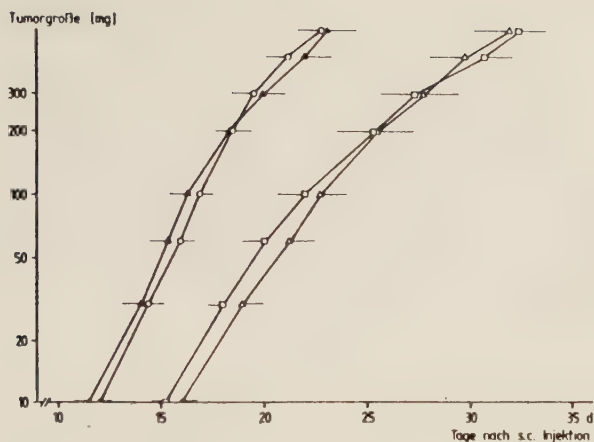


Abb. 3.11: Gemittelte Wachstumskurven von tumor takes nach quantitativer Transplantation von $\square = 64$, $\triangle = 256$, $\circ = 1024$, $\blacktriangle = 4096$ Zellen aus unbehandelten Adenokarzinomtumoren.

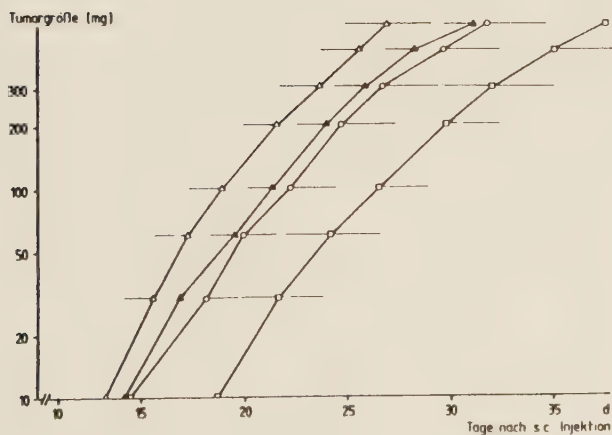


Abb. 3.12: Gemittelte Wachstumskurven von tumor takes nach quantitativer Transplantation von $\square = 1560$, $\circ = 6240$, $\blacktriangle = 24960$ und $\triangle = 99840$ Zellen aus mit 20 mg/kg ADR vorbehandelten Adenokarzinomtumoren.

bei Vorbehandlung mit 20 mg/kg ADR. Bei Vorbehandlung mit 40 mg/kg ADR läßt sich entsprechend eine Verdopplungszeit von 1,43 d, bei 50 mg/kg ADR von 1,53 d ermitteln. Für das Fibrosarkom liegen die aus den Latenzzeitkurven für behandelte und unbehandelte Tumoren abgeleiteten subklinischen Verdopplungszeiten alle um 1,25 Tage.

In Abb. 3.13 sind die durchschnittlichen Latenzzeiten in Abhängigkeit von der injizierten Zellzahl für die verschiedenen Behandlungsgruppen beim Adenokarzinom mit Standardabweichung aufgetragen. Für jede Dosisgruppe wurde eine Regressionsgerade durch die Punkte berechnet. Für das Adenokarzinom ergeben sich Regressionsgeraden, die angesichts der erheblichen Streuung der Einzelpunkte in ihrer Steigung nicht voneinander zu unterscheiden sind.

Um gleiche Latenzzeiten zu erreichen, müssen um so höhere Zellinokula verimpft werden, je höher die Vorbehandlungsdosis mit ADR war. Die zum Erzielen einer Latenzzeit von 20 d für die verschiedenen Dosisgruppen notwendigen Zellinokula sind in Tab. 3.6 gegen die entsprechenden Behandlungsdosen aufgetragen. Die Größe der Zellinokula nimmt bis 20 mg/kg ADR deutlich, bei ADR-Dosen über 20 mg/kg kaum noch zu. Eine ADR-Dosierung über 20 mg/kg führt also zu keiner wesentlichen Verlängerung der Latenzzeiten bei Verimpfung gleich großer Zellinokula. Die dosisabhängige Steigerung der notwendigen Zellinokulagrößen gegenüber den Kontrollen stimmt auch Größenmäßig mit den über die TD50 bestimmten Überlebensraten überein. Die Untersuchung supraletaler ADR-Dosen ist in diesem assay ohne weiteres möglich, weil akute Schäden an Normalgeweben (Darm, Knochenmark) in 24 Stunden nicht kritisch werden.

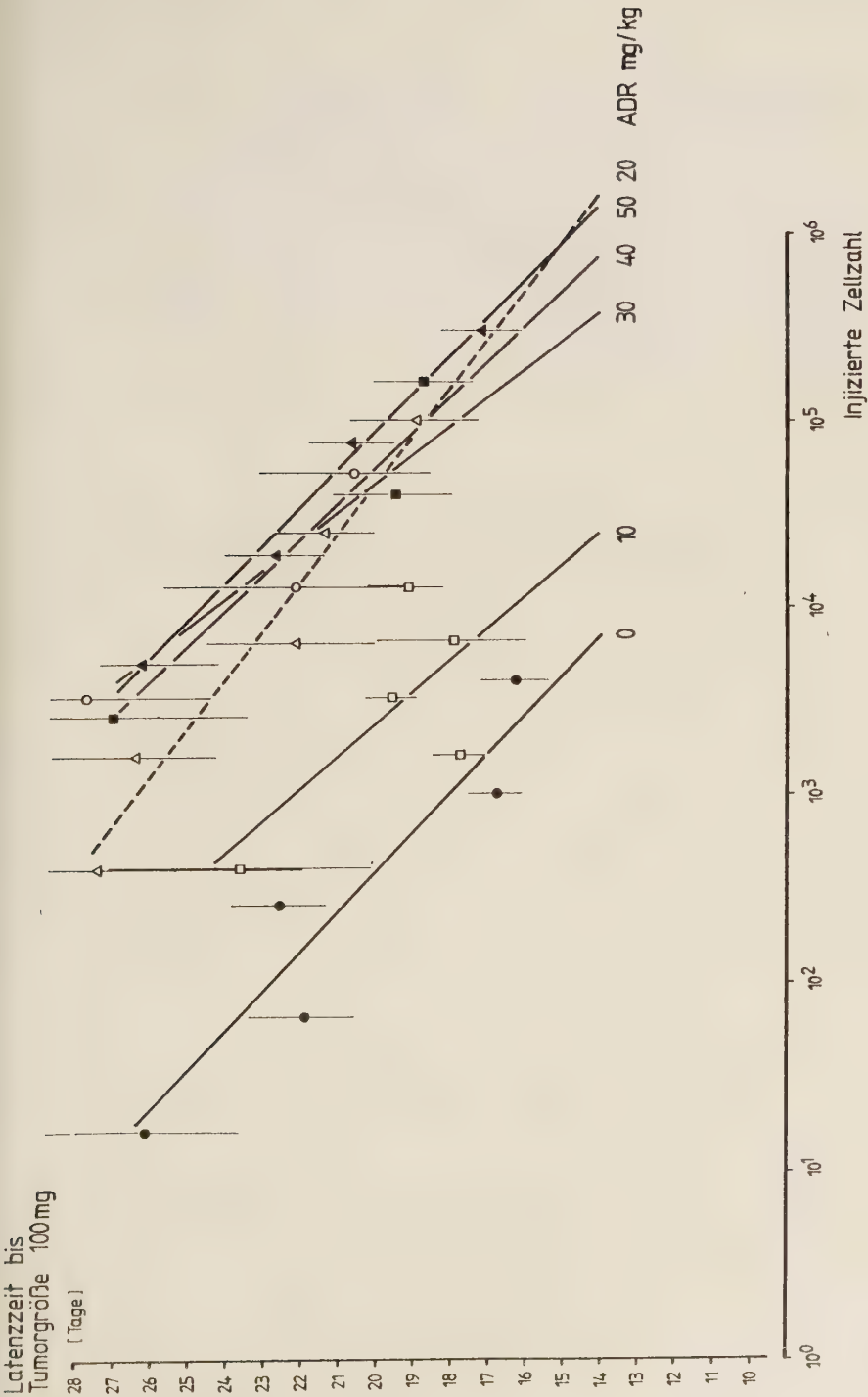


Abb. 3.13: Durchschnittliche Latenzzeiten von tumor takes zum Erreichen von 100 mg Gewicht gegen die Zahl transplantiert vitaler Adenokarzinomzellen.
● = Kontrollen, □ = 10 mg/kg, △ = 20 mg/kg, ■ = 30 mg/kg, ○ = 40 mg/kg, ▲ = 50 mg/kg ADR-Vorbehandlung der Spendertumoren.

ADR-Dosis [mg/kg]	Zellinokula	Relative Zellinokula (Kontrolle = 1)
0	400	1
10	2400	6
20	45000	112,5
30	45000	112,5
40	55000	137,5
50	80000	200

Tab. 3.6: Zellinokulagrößen beim Adenokarzinom, bei denen tumor takes zum Erreichen einer Größe von 100 mg eine Latenzzeit von 20 d benötigen in Abhängigkeit von der jeweiligen ADR-Vorbehandlungsdosis

Die Latenzzeitkurven von Fibrosarkomzellen (Abb. 3.14) aus mit ADR behandelten Spendern unterscheiden sich - anders als beim Adenokarzinom - bis auf eine Ausnahme (20 mg/kg ADR 1 Tag vor Entnahme) nicht signifikant von der Latenzzeitkurve der unbehandelten Fibrosarkomzellen, decken sich sogar beinahe mit ihr. Dies erhärtet die aus den Ergebnissen der Wachstumsverzögerung gezogene Schlußfolgerung, nämlich daß die Überlebensrate der Fibrosarkomzellen auch durch hohe Dosen von ADR nur wenig zu beeinflussen ist.

3.2.3 ADR-Empfindlichkeit von Tumoren aus vorbehandelten Tumorzellen

Zur Ermittlung der ADR-Empfindlichkeit von Tumoren, abgeleitet von Zellen, die eine ADR-Behandlung überlebt hatten, wurden Adenokarzinomtumoren untersucht, die nach Transplantation von Zellen aus mit 50 mg/kg ADR

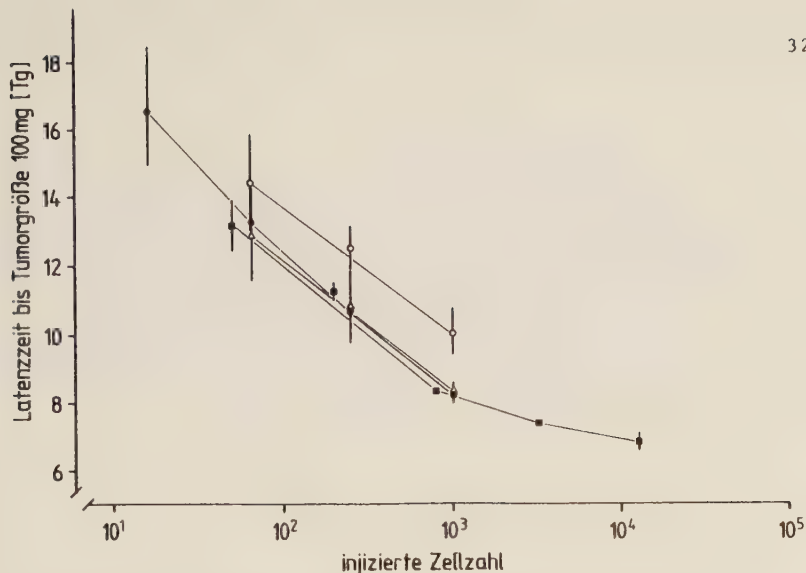


Abb. 3.14: Durchschnittliche Latenzzeiten von tumor takes zum Erreichen von 100 mg Gewicht gegen die Zahl transplanteder vitaler Fibrosarkomzellen.

● = Kontrollen, ○ = 20 mg/kg, 1 Tag Abstand, △ = 20 mg/kg, 2 Tage Abstand, ■ = 40 mg/kg ADR-Vorbehandlung der Spendertumoren.

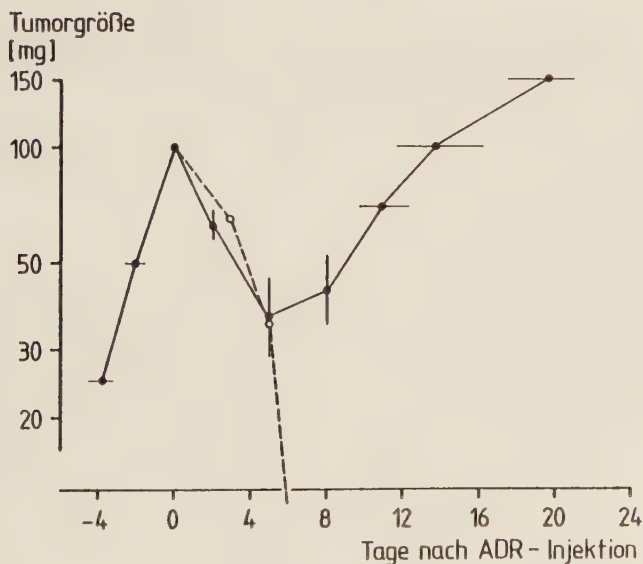


Abb. 3.15: Mittlere Wachstumskurven von tumor takes des Adenokarzinoms bei Vorbehandlung der Spendertiere mit 50 mg/kg.

● = EZD von 15 mg/kg ADR, ○ = 1 Heilung nach EZD von 15 mg/kg.

vorbehandelten Spendertumoren gewachsen waren. Abb. 3.15 zeigt die entsprechenden gemittelten Wachstumskurven. Die Tumoren durchliefen nach Behandlung mit 15 mg/kg ADR eine deutliche Remission und erreichten erst 14 Tage nach Behandlung das Ausgangsgewicht wieder. Nicht vorbehandelte Adenokarzinomtumoren brauchten nur 6 Tage, um nach Behandlung mit 15 mg/kg ADR ihr ursprüngliches Gewicht wieder zu erreichen.

3.3 Histologische Untersuchung

3.3.1 Morphologische und morphometrische Auswertung akuter Behandlungseffekte

Von den für die quantitative Transplantation verwendeten Spendertumoren wurden Hämalaun-Eosin-gefärbte Präparate nach dem in 2.7 beschriebenen Punktzählverfahren auf ihre Gewebszusammensetzung untersucht. Die relativen Anteile von Zellkernen, Zellplasma, Stroma und Nekrosen sind für unbehandelte und behandelte Tumoren in Tab. 3.7 wiedergegeben. Es ergeben sich folgende Befunde für beide Tumorarten:

Beim Fibrosarkom ist der Stromaanteil mit 2,6 % äußerst niedrig. Entsprechend groß ist mit 87,6 % die Tumorzell-dichte, wobei mit 59,2 % das Zellplasma den meisten Raum fordert. Demgegenüber beträgt der Stromaanteil beim Adenokarzinom 25,4 %. Der Nekroseanteil unbehandelter Tumoren ist mit 9,8 % beim Fibrosarkom und 3,2 % beim Adenokarzinom gering.

ADR-Dosis Tumor [mg/kg]	Intervall [d]	Tumorzell- kerne	Tumorzell- plasma	Stroma	Nekrosen
Adenokarzinom					
0		29,1 %	42,3 %	25,4 %	3,2 %
20	1	25,7 %	47,8 %	19,4 %	7,1 %
40	1	26,8 %	45,0 %	25,3 %	2,9 %
Fibrosarkom					
0		28,4 %	59,2 %	2,6 %	9,8 %
20	1	24,3 %	70,6 %	0,9 %	4,2 %
20	2	25,8 %	66,7 %	2,2 %	5,3 %

Tab. 3.7: Relative Anteile von Zellkernen, Zellplasma, Stroma und Nekrosen für behandelte und unbehandelte Adenokarzinome und Fibrosarkome.

Bei Behandlung mit 20 mg/kg ADR 24 Stunden vor Entnahme der Tumoren nimmt der Nekroseanteil beim Fibrosarkom nicht, beim Adenokarzinom nur geringfügig auf 7,1 % zu. Die Kern-Plasma-Relation verschiebt sich bei beiden Tumoren leicht zugunsten des Zellplasmas, was durch Zellschwellung der durch ADR geschädigten Tumorzellen verursacht wird. Die nach Vorbehandlung mit 40 mg/kg ADR gewonnenen histologischen Präparate des Adenokarzinoms unterscheiden sich davon nicht signifikant.

3.3.2 Markierungsindex

Durch Autoradiographie (Abschn. 2.7) wurde für unbehandelte und behandelte Fibrosarkome und Adenokarzinome der ^3H -TdR-Markierungsindex der Tumorzellen ermittelt. Der Markierungsindex gibt Auskunft über den Anteil der Zellen in der DNS-Synthesephase und somit über die proliferative Aktivität.

In Wechselgeweben und bei Tumoren mit hoher Proliferationsgeschwindigkeit, bei denen die Wachstumsfraktion relativ groß ist, ist ein hoher Markierungsindex zu erwarten.

Unbehandelt hat das Fibrosarkom einen Markierungsindex von 37 %, das Adenokarzinom von 28 %.

Behandlung mit ADR wirkte sich auf den Markierungsindex bei Fibrosarkom und Adenokarzinom unterschiedlich aus. So verringerte sich der Markierungsindex bei einer Dosis von 20 mg/kg ADR beim Fibrosarkom nur geringfügig auf 27 %, beim Adenokarzinom dagegen auf 7 %, bei einer Behandlung mit 40 mg/kg sogar auf 2,4 %. Die Zellproliferation wird also beim Fibrosarkom durch ADR nach einem Tag nur wenig gehemmt, während beim Adenokarzinom eine akute Stagnation der Zellvermehrung zu beobachten ist.

4. Diskussion

4.1 Ableitung der zellulären Überlebensrate aus den Ergebnissen der quantitativen Transplantation von Tumorzellen

Die Technik der quantitativen Transplantation von Tumorzellen, auch Endpoint Dilution Assay genannt, wurde zum ersten Mal 1959 von Hewitt und Wilson an Leukämiezellen der Maus angewandt (11). Sie dient in erster Linie dazu, Information über die Zellüberlebenskurve in vivo zu erhalten (Berry und Andrews 1961 (2), Reinhold 1967 (15)); darüber hinaus gibt sie jedoch auch Einblicke in die Transplantationskinetik maligner Zellen, wie sie beispielsweise für das Verstehen des Metastasierungsprozesses wichtig sind.

Dem Endpoint Dilution Assay lag folgende Theorie zugrunde:

1. Die transplantierten vitalen Tumorzellen enthalten einen bestimmten Anteil an klonogenen Stammzellen.
2. Um einen Tumor zu erzeugen, muß das Transplantat mindestens eine klonogene Zelle enthalten.
3. Die Wahrscheinlichkeit P_x , daß eine Anzahl x klonogener Zellen im Inokulum enthalten ist, wird dabei durch die Poisson-Verteilungsfunktion bestimmt. In Umkehrung des zweiten Punktes (s.o.) läßt sich sagen, daß keine Transplantation möglich ist, wenn ein Inokulum keine einzige Stammzelle enthält. Diese Häufigkeit wird in der Poisson-Verteilung durch den Ausdruck

$$P_0 = e^{-m}$$

beschrieben, wobei m den Mittelwert klonogener Zellen bedeutet. Demnach kann man bei gleicher Angehänge von der gleichen mittleren Anzahl klonogener Stammzellen ausgehen. Die klonogene Fraktion wird durch eine Vorbehandlung mit Strahlen bzw. Zytostatika entsprechend der jeweiligen Überlebensrate verringert.

4.1.1 Repräsentativität der Tumorzellsuspensionen bei der quantitativen Tumorzelltransplantation

Beim Adenokarzinom 284 sind die Tumorzellen fast durchgehend in Form von Azini organisiert, wobei die peripher liegenden Zellen infolge ihrer Gefäßnähe besser durchblutet werden. Sutherland (24) beobachtete 1979, daß ADR in vitro auf multizelluläre Sphäroide weniger toxisch wirkt als auf Einzelzellen. Er führte dieses Phänomen auf einen Diffusionsgradienten für das Eindringen von ADR in die Sphäroide zurück, zumal im Inneren der Sphäroide niedrigere ADR-Konzentrationen gemessen wurden. So wäre es naheliegend, daß bei ADR-Behandlung in vivo infolge eines Konzentrationsgefälles zum Zentrum der Azini hin gefäßferne Zellen weniger Zytostatikum aufnehmen als gefäßnahe Zellen. Weiter könnte die relative Hypoxie der gefäßfernen Zellen ähnlich wie bei Strahlenbehandlung eine Resistenz der betreffenden Zellen zur Folge haben, wovon später noch die Rede sein wird.

Die Tumorzellpopulation ist also in sich sicher nicht homogen. Vielmehr enthält sie euoxische und hypoxische Zellen, zudem unterscheiden sich wahrscheinlich die Tumorzellen in der intrazellulären ADR-Konzentration voneinander. Für die Messung des Behandlungseffektes mittels des Endpoint Dilution Assays ist es daher von Be-

deutung, daß mit der Präparation der Einzelzellsuspension ein repräsentativer Querschnitt durch die Gesamtpopulation erhalten wird und nicht durch selektive Anreicherung oder Aussparung Verzerrungen auftreten.

Ein spezielles Problem taucht durch das lange Intervall (24 bzw. 48 Stunden) bis zur Exzision der Tumoren auf. Hätte die Adriamycinbehandlung schon in den 24 Stunden bis zur Entnahme und Aufbereitung der Spendertumoren zu Nekrosen der letal geschädigten Zellen geführt, wäre eine Selektion zugunsten überlebender Zellen erfolgt und somit die ermittelte Überlebensrate zu hoch gewesen. Dagegen spricht, daß sich die mit ADR vorbehandelten Tumoren im prozentualen Anteil an eosinpositiven Zellen nicht signifikant von unbehandelten Tumoren unterscheiden. Weiter konnte in der histologischen Untersuchung vorbehandelter Spendertumoren gegenüber unbehandelten Tumoren keine Häufung von Nekrosen beobachtet werden. Dies schließt jedoch das Auftreten von Zellnekrosen bis zur Entnahme des Tumors nicht mit letzter Sicherheit aus, da nekrotisches Zellmaterial sehr schnell aus dem Tumor abtransportiert wird und somit in der histologischen Untersuchung möglicherweise nicht mehr nachweisbar ist. Bei den Regrowth-Delay-Versuchen wurde jedoch eine entsprechende makroskopische Schrumpfung der Tumoren innerhalb der ersten 24 Stunden nach Behandlung mit ADR nicht beobachtet, eher nahmen die Tumoren in diesem Zeitraum nach Behandlung noch etwas an Größe zu. Ein Zellverlust kann makroskopisch allerdings kompensiert werden durch eine Zellschwellung. Tatsächlich verschiebt eine ADR-Behandlung die Kernplasma-Relation nur geringfügig zugunsten des Zellplasmas. So nimmt der Plasma-Anteil durch Behandlung mit 20 mg/kg ADR beim Adenokarzinom von 42,3 % bei den Kontrollen auf 47,8 %

zu, bei einer Dosis von 40 mg/kg ADR beträgt der Plasmaanteil 45,0 %. Beim Fibrosarkom ist die Zellschwel- lung etwas ausgeprägter, hier nimmt der Plasmaanteil bei Behandlung mit 20 mg/kg ADR von 59,2 % auf 70,6 % zu. In beiden Tumoren scheint die absolute Zellzahl demnach 24 Stunden nach ADR auch bei hoher Dosierung nicht wesentlich verändert.

4.1.2 Die Zellüberlebenskurve nach ADR-Behandlung

Bei der quantitativen Transplantation von Tumorzellen wurden aus Tumoren vorbehandelter Spendertiere Zellsuspensionen definierter Zellzahl hergestellt, die gesunden Mäusen subkutan oder intramuskulär injiziert wurden. Die durch nachfolgende Beobachtung und Berechnung (Verfahren nach Finney (9)) ermittelte Zellzahl, bei der 50 % Angehrate erzielt wurde, die sogenannte TD 50, wurde dann jeweils mit der TD 50 unbehandelter Zellen verglichen. Die Überlebensrate der Stammzellen ist entsprechend definiert durch den Quotienten aus TD 50 behandelt/TD 50 unbehandelt.

Beim Fibrosarkom nimmt die Überlebensrate bei einer Behandlungs- dosis von 20 mg/kg ADR nur auf 78,5 % ab.

Beim Adenokarzinom ist die Überlebensrate ungleich kleiner als beim Fibrosarkom. Schon bei einer Dosis von 10 mg/kg ADR überleben nur noch ca. 3 % der Zellen. Der initiale Verlauf ist vermutlich exponentiell bis 15 mg/kg ADR mit einer D_{50} von 3 mg/kg. Nach einem deutlichen Knick bei 15 mg/kg verläuft die Kurve beinahe horizontal weiter. Der Effekt einer Dosissteigerung über 15 mg/kg hinaus ist demnach sehr gering.

Diese Form der Zellüberlebenskurve läßt auf eine ADR-

resistente Subpopulation von 2 % der Gesamtzellzahl schließen. Barranco et al (1) beschrieben eine solche biphasische Überlebenskurve nach Behandlung asynchron wachsender Populationen chinesischer Hamsterzellen in vitro. Die Größe des resistenten Kompartments betrug hier 0,2 %. Für die Behandlung von Thymidin-synchronisierten Chinese Hamster Ovary-Zellen mit ADR in verschiedenen Zyklusphasen wies Barranco nach, daß die Zellen in G₁-Phase und später S-Phase weit weniger empfindlich waren als Zellen in Mitose und früher S-Phase. Dennoch kann nach Barranco daraus keine Phasenspezifität von ADR abgeleitet werden, da es trotz abgeschwächter Wirksamkeit in G₁ und später S-Phase Zellen in allen Phasen des Zellzyklus tötet. Zudem müßte ein Kompartiment von resistenten G₁-Phase-Zellen um Dekaden größer sein als 0,2 %. Die geringere Empfindlichkeit von G₁-Phase-Zellen gegenüber ADR konnte von Harris (10) auf eine geringere Aufnahme von ADR zurückgeführt werden.

Denkbar ist auch die Existenz einer von ihren genetischen Eigenschaften her gegen ADR resistenten Subpopulation. Diese Möglichkeit wurde durch ADR-Nachbehandlung von Tumoren widerlegt, die nach quantitativer Transplantation von Zellen aus vorbehandelten Spender-tumoren gewachsen waren. Diese Tumoren, in denen durch die Vorbehandlung mit ADR eine Selektion ADR-resistenter Zellen hätte stattfinden müssen, erwiesen sich als ebenso sensibel wie unbehandelte Tumoren.

ADR-Phasenspezifität sowie eine genetisch gegen ADR resistente Subpopulation können für den vorgefundenen biphasischen Kurvenverlauf ausgeschlossen werden. In der Zellkultur fanden Barranco (s.o.) an CHO-Zellen, Drewinko und Gottlieb an T₁-Zellen (7), Twentyman an EMT6-Zellen (30) mit ADR eine biphasische Überlebens-

kurve, allerdings erst unter einer Überlebensrate von 2 %. Neue Untersuchungen von Eichholtz an Hela-Zellen und chinesischen Hamsterzellen ergaben rein exponentielle, monophasische Überlebenskurven (8). Mit keinem dieser Versuche kann das Umknicken der Überlebenskurve aus der quantitativen Transplantation schon bei einer Überlebensrate von 2 % erklärt werden. Der Grund muß also in der speziellen Situation liegen, die bei der Behandlung solider Tumoren in vivo auftritt.

In den meisten soliden Tumoren hinkt das Wachstum des Gefäßbettes dem Tumorstadium hinterher. Mit zunehmender Tumorgroße treten daher in Arealen mit schlechter Gefäßversorgung Effekte der Malnutrition, vor allem Gewebsazidose, Zellhypoxie und Zellnekrose in den Vordergrund. Diese Areale hypoxischer Zellen haben eine große Bedeutung für die Behandlung der meisten soliden Tumoren, da sich hypoxische Zellen gegenüber einer Behandlung mit Strahlen immer und Zytostatika oft als resistenter erweisen als die euoxischen Zellen. Die kleinere Empfindlichkeit dieser hypoxischen Zellfraktion in einem soliden Tumor führt bei Einzeitbestrahlung von Tumoren sogar regelmäßig zu einem biphasischen Verlauf der Überlebenskurve.

Born und Eichholtz-Wirt (4) untersuchten den Effekt von Zellhypoxie auf die Behandlung von chinesischen Hamsterzellen B14 mit Adriamycin in vitro. Dabei fanden sie eine gegenüber euoxischen Zellen fünfmal höhere Resistenz chronisch hypoxischer Zellen. Dieselbe Beobachtung machten Smith, Stratford und Adams (21).

Auch im Adenokarzinom kann eine solche hypoxische Zellfraktion postuliert werden, zumal sich bei der histologischen Untersuchung des Tumors vereinzelt Areale mit Zellnekrosen fanden. Diese und die in vitro-Untersuchungen von Born und Eichholtz-Wirth legen den Schluß

nahe, daß der Knick der Zellüberlebenskurve beim Adenokarzinom durch die größere Resistenz der hypoxischen Zellfraktion gegenüber ADR-Behandlung verursacht wird. Der steile Abschnitt der Kurve wäre demnach durch die Inaktivierung der euoxischen Zellen, der bei einer Überlebensrate von ca. 2 % beginnende flachere Kurvenabschnitt durch die weitgehende Resistenz der hypoxischen Zellen bestimmt.

4.1.3 Rückschlüsse aus der Latenzzeit bei der quantitativen Transplantation

Sowohl bei den Kontrollen als auch bei der Verimpfung vorbehandelter Zellen wurde mit zunehmender Zellzahl eine Abnahme der Latenzzeiten zum Erreichen einer Tumorgroße von 100 mg (Abb. 3.13) beobachtet. Daraus läßt sich auf die Verdopplungszeit im subklinischen Bereich schließen. So müßte z.B. eine Latenzzeitverkürzung, die durch Vergrößerung des Inokulums um den Faktor 4 erreicht wird, zwei Verdopplungszeiten entsprechen. So wurde für jede Dosisgruppe aus dem Mittel der entsprechenden Latenzzeitverkürzungen die jeweilige Tumoverdopplungszeit errechnet. Bei einer Dosis von 20 mg/kg ADR liegt die Verdopplungszeit der Adenokarzinome mit 1,09 d sogar unter der Verdopplungszeit von 1,24 d bei den Kontrollen, steigt dann aber bei 40 mg/kg ADR auf 1,43 d und bei 50 mg/kg ADR auf 1,53 d an. Beim Fibrosarkom liegen die so abgeleiteten subklinischen Verdopplungszeiten für behandelte wie unbehandelte Tumoren alle bei 1,25 Tagen. Demnach würde sich die Wachstumsgeschwindigkeit im subklinischen Bereich bei Vorbehandlung mit hohen ADR-Dosen gegenüber den Kontrollen nur geringfügig verringern. Dem entspricht auch die gegenüber den Kontrollen nicht signifikant veränderte Stei-

gung der Regressionsgeraden in den verschiedenen Behandlungsgruppen.

Weiter korrelieren die in den verschiedenen Behandlungsgruppen zur Erzielung der gleichen Latenzzeit verimpften Zellinokulagrößen gut mit der Zellüberlebenskurve. So steigt die Größe der Zellinokula, die zum Erreichen einer Tumorgröße von 100 mg eine Latenzzeit von 20 Tagen benötigen (Tab. 3.6), bei Vorbehandlung mit ADR-Dosen über 20 mg/kg kaum noch an, was mit dem stagnierenden Zellabsterbeverhalten bei ADR-Dosen über 15 mg/kg gut übereinstimmt (Vgl. Abb. 3.10).

Die aufgrund der großen Streuung der Meßpunkte freilich nur halbquantitative Auswertung der Latenzzeiten bei der quantitativen Transplantation von Tumorzellen legt den Schluß nahe, daß Adenokarzinomzellen, die eine Vorbehandlung mit ADR überlebt haben, in vivo kaum langsamer wachsen als unbehandelte Zellen.

4.1.4 Intrazelluläre ADR-Konzentrationen in Adenokarzinom und Fibrosarkom

Von Mitarbeitern der Gruppe Experimentelle Tumorthherapie wurden nach Behandlung mit unterschiedlichen ADR-Dosen in vivo Messungen der intrazellulären ADR-Konzentration mit der fluorimetrischen Methode nach Schwartz (18) in verschiedenen Organen und Tumoren, u.a. bei Adenokarzinom 284 und Fibrosarkom AT 24 durchgeführt*. Abb. 4.1 zeigt die Beziehung zwischen verabreichter ADR-Dosis und intrazellulärer ADR-Konzentration für beide Tumoren nach intraperitonealer Injektion 24 Stunden vor Gewebsentnahme. Zumindest beim Adenokarzinom

* Für die Überlassung der Werte danke ich Frau Dr. Eichholtz-Wirth.

ergibt sich eine lineare Beziehung. Besonders augenfällig sind die wesentlich höheren ADR-Konzentrationen beim Adenokarzinom im Vergleich zum Fibrosarkom. So wird durch Behandlung mit 15 mg/kg ADR beim Adenokarzinom eine intrazelluläre ADR-Konzentration von 0,525 µg/100 mg erzielt, während beim Fibrosarkom die Konzentration so klein ist, daß sie wegen des nicht unbeträchtlichen Hintergrundwertes nicht erfaßt werden kann. Selbst bei einer enorm hohen Dosis von 40 mg/kg ADR wird beim Fibrosarkom erst eine intrazelluläre Konzentration von 0,13 µg/100 mg erreicht. Die intrazelluläre Aufnahme von ADR ist also beim Fibrosarkom sehr gering, was sicher einer der Gründe für die ADR-Resistenz dieses Tumors sein dürfte.

4.2 Wachstumsverzögerung von Tumoren durch ADR-Behandlung in vivo

4.2.1 Überlegungen zur Meßmethode

Die in Abschnitt 2.4 erläuterte Messung des Tumorumfanges mit Lochschablonen, die zunächst nur eine Tumorphotographie erfaßt, unterliegt möglichen Fehlerquellen, wie etwa abweichende Tumorphotographie und subjektive Meßfehler, und gibt nur annäherungsweise das tatsächliche Gewicht des Tumors wieder. Sie erfordert eine Kalibrierung solcher Meßwerte mit der tatsächlichen Tumormasse durch Vergleich der externen Messung mit dem Tumorgewicht nach Exzision. Mit Einübung des Meßverfahrens ist es auch möglich, nicht subkutan gelegene Tumoren mit ausreichender Sicherheit durch Palpation einer Flächengröße, bzw. einer Tumormasse zuzuordnen; dieser Weg mußte beim Fibrosarkom beschritten werden. In Abb. 4.2 sind die mittleren Tumorgewichte, wie sie nach Abtöten

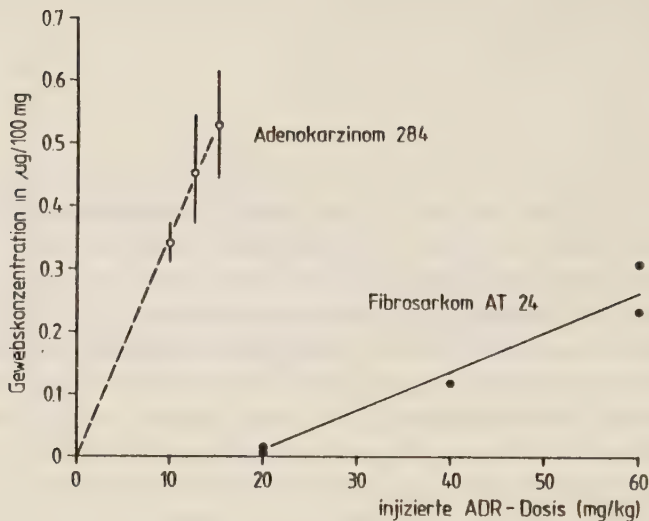


Abb. 4.1: In vivo verabreichte ADR-Dosis gegen intrazelluläre ADR-Konzentration in
 O = Adenokarzinom und ● = Fibrosarkom
 (Mit freundlicher Genehmigung von Frau Dr. Eichholtz-Wirth)

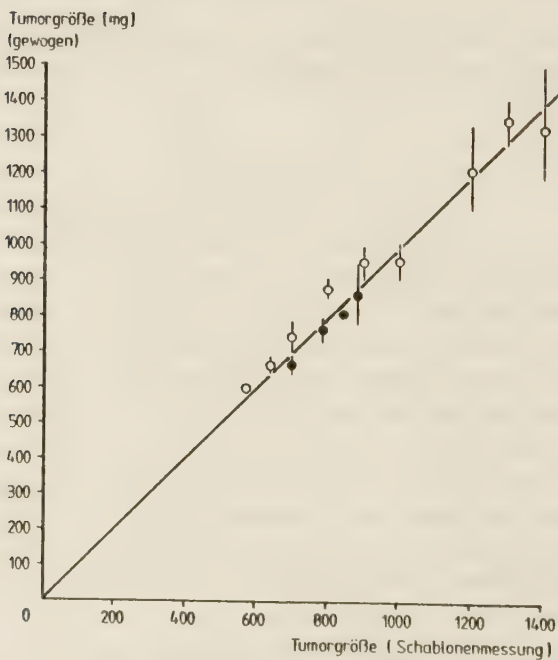


Abb. 4.2: Objektivierung der Tumorgewichtsmessung mit Schablone. Es sind die Schablonenmeßwerte gegen die entsprechenden durch Wägung ermittelten Meßwerte aufgetragen.
 ● = Adenokarzinom; O = Fibrosarkom

der Tiere und Tumorpräparation durch Wägung festgestellt wurden, gegen die jeweils kurz vor der Tötung extern ermittelten Schablonenmeßwerte aufgetragen, wobei ein Meßbereich zwischen 600 mg und 1500 mg erfaßt wurde. Die absolute Streuung der Werte nimmt mit zunehmendem Tumorgewicht zu. Die Mittelwerte der Wägungen sind beim Fibrosarkom systematisch leicht höher, beim Adenokarzinom etwas niedriger, als der Schablonenmessung entspricht. Die prozentuale Abweichung der Einzelwerte beträgt zwischen 1,7 % und 3,5 % beim Adenokarzinom, zwischen 4 % und 7,1 % beim Fibrosarkom. Insgesamt weichen die Mittelwerte jedoch von der eingezeichneten Regressionsgeraden nur unbedeutend ab. Da sich zudem der Fehler bei der Schablonenmessung zu kleineren Tumorgewichten hin noch verringert, wurde bei der Auswertung der Versuchsergebnisse darauf verzichtet, die externe Größenmessung durch die terminal festgestellten Tumorgewichte zu korrigieren.

4.2.2 Begründung des doppelten Behandlungsgewichts als Parameter für die Wachstumsverzögerung von Tumoren in vivo

Der Regrowth Delay Assay wurde von Thomlinson und Craddock (27) eingeführt, um die Wirkung von Strahlenbehandlung auf das Wachstum von Tumoren in vivo zu messen.

Da das Rezidivwachstum nach einer Behandlung mit Strahlen bzw. Zytostatika naturgemäß immer von den überlebenden Stammzellen ausgehen muß, lassen sich aus den nach Behandlung von Tumoren beobachteten Wachstumskurven Rückschlüsse auf das zelluläre Absterbeverhalten nach einer Behandlung ziehen. Hierbei gilt die Einschränkung, daß sich das Tumolvolumen unter oder auch

nach Behandlung nicht annähernd proportional zur Anzahl überlebender Stammzellen verhält, sondern von anderen Faktoren entscheidend beeinflusst wird. So schrumpft der Tumor makroskopisch keinesfalls entsprechend der zellulären Absterbequote, vielmehr werden die Zelluntergänge im Tumor makroskopisch zunächst maskiert durch noch nicht abgeräumtes nekrotisches Material, durch abortive Teilungen endgültig nicht überlebender Zellen und eventuell auch durch interstitielles und zelluläres Ödem der geschädigten Tumorzellen. Je kleiner jedoch der Anteil an Überlebenden Stammzellen in einem Tumor ist, um so länger sind die Latenzzeiten zum Erreichen einer vorgegebenen Rezidivgröße in der Phase progressiven Wiederwachstums.

Ein Kleinerwerden des Tumors wurde beim Fibrosarkom nicht, beim Adenokarzinom nur bei 15 mg/kg ADR (höchste in vivo tolerierte Dosis) beobachtet. Stattdessen zeigten viele Einzeltumoren nach Behandlung mit ADR erst nach einer Phase zusätzlichen Wachstums ein Abweichen von der Kontrollkurve in Form eines Plateaus bzw. einer Regression, bevor sie in progressives Wiederwachstum eintraten. Um die therapieinduzierte Wachstumsverzögerung gegenüber den Kontrollen zu ermitteln, ist also die Zeit zum Wiedererreichen des Behandlungsgewichts ungeeignet, da dieses in der Regel nicht unterschritten wurde. Als Endpoint für den Regrowth Delay Assay bot sich daher bei beiden Tumoren das doppelte Behandlungsgewicht an, da es erst nach Ablauf der unmittelbaren Behandlungswirkung und nach Wiedereintritt der Tumoren in schnelles Rezidivwachstum überschritten wurde. Die so gemessene Wachstumsverzögerung gegenüber den Kontrollen wird dabei zum einen durch die dosisabhängige Inaktivierung von Tumorzellen, zum anderen durch eine Schädigung des Tumorbettes (Holler (12)) mit möglicher Verlangsamung des Rezidivwachstums verursacht. Ein

solcher Effekt auf das Rezidivwachstum läßt sich im makroskopischen Wachstumsbereich erfassen, beispielsweise anhand der Zeit, die der Tumor braucht, um vom doppelten zum vierfachen Behandlungsgewicht zu gelangen. Die T_2/T_4 ist beim Fibrosarkom in den verschiedenen Dosisgruppen nur geringfügig größer als die der Kontrollen (siehe Seite 17). Beim Adenokarzinom hingegen nimmt sie von 2,01 d in der Kontrollgruppe auf 3,33 d in der mit 5 mg/kg ADR behandelten Gruppe zu. Bei 15 mg/kg ADR beträgt sie sogar 5,23 d (Tab. 3.4). Demnach übt ADR auf die Rezidivwachstumsrate des Adenokarzinoms einen deutlichen dosisabhängigen Einfluß aus, während ein solcher Tumoreffekt beim Fibrosarkom kaum nachweisbar ist. Aufgrund der früher beschriebenen relativ geringen Unterschiede in der subklinischen Verdopplungszeit läßt sich jedoch sagen, daß dieser retardierende Effekt erst im makroskopischen Wachstumsbereich eintritt und daher die Wachstumsverzögerung nur gering beeinflußt.

4.2.3 Hypothetische Dosiswirkungskurven der Wachstumsverzögerung von Tumoren in vivo

Bevor die eigene Dosiswirkungskurve besprochen wird, sollen Modellvorstellungen erörtert werden. Bei den nachfolgenden Überlegungen wird von einer exponentiellen Beziehung zwischen ADR-Dosis und Zellüberlebensrate ausgegangen, entsprechend dem bis zu 15 mg/kg ADR exponentiellen Verlauf der bei der quantitativen Transplantation von Tumorzellen ermittelten Zellüberlebenskurve.

$$1) N_D = N_0 \cdot e^{-aD}$$

N_0 = Zellzahl vor Behandlung
 N_D = Zahl der überlebenden Zellen
 a = Inaktivierungskoeffizient
 D = Dosis

Im Gegensatz zu dem oben (Seite 38) beschriebenen makroskopischen Verhalten des Tumors nach einer ADR-Behandlung, das eine Verschiebung der Relation Tumorumfang zu Überlebenden Zellen zugunsten des Tumorumfanges bewirkt, wird in diesem theoretischen Ansatz diese Relation auch unter ADR-Behandlung als konstant betrachtet. Ein Tumor der Größe V_0 erreicht also, wenn von N_0 Stammzellen N_D Stammzellen die Behandlung überleben, ein theoretisches Volumen von

$$V_D = V_0 \cdot \frac{N_D}{N_0}$$

Gleichung I läßt sich demnach umformen in:

$$II) \quad V_D = V_0 \cdot e^{-aD}$$

Die daraus resultierende Wachstumsverzögerung des Tumors wird auch vom Wachstumsverhalten des Tumors nach Behandlung bestimmt werden. Das Wachstumsverhalten in dem subklinischen Bereich, auf den der Überlebende Tumorumfang durch die Behandlung reduziert wird, könnte anderen nutritiven Bedingungen als im makroskopisch beobachtbaren Bereich unterliegen. Im folgenden werden zwei häufig diskutierte Modelle besprochen.

Logisch wäre zunächst die Annahme eines rein exponentiellen Rezidivwachstums der Überlebenden Zellen, wie es dem exponentiellen Wachstum von Tumorzellen in vitro entspräche. Für kleine Tumoren, bzw. sinngemäß für die aus der Behandlung resultierenden Resttumoren wird eine solche Charakteristik von verschiedenen Autoren beschrieben (Steel (22), Trott (28)). Für das Wachstum des Resttumors gilt dann:

$$\text{III) } V_T = V_0 \cdot e^{bT}$$

V_0 = Ausgangsvolumen

V_T = Tumolvolumen nach
Wachstumsdauer T

b = Wachstumskoeffizient

T = Wachstumsdauer

Bei Annahme eines exponentiellen Wachstums ließe sich die Dosiswirkungsbeziehung des Zellüberlebens aus der Wachstumsverzögerung von Tumoren wie folgt errechnen:

$$\text{II: } V_D = V_0 \cdot e^{-aD}$$

$$\text{III: } V_0 = V_D \cdot e^{bT}$$

$$V_D = V_0 \cdot e^{-bT}$$

$$\text{II in III: } -aD = -bT$$

$$D = \frac{b}{a} T$$

$$D \sim T$$

Bei exponentieller Inaktivierung und exponentieller Kinetik des Wiederwachstums des Tumors resultiert also eine lineare Beziehung zwischen Wachstumsverzögerung und Behandlungsdosis.

Für zahlreiche solide Experimentaltumoren (22), sowie menschliche Tumoren (28) wurden jedoch Wachstumskurven ermittelt, die mit zunehmender Größe immer mehr gegenüber dem exponentiellen Wachstum an Steigung abnehmen, wie dies im makroskopischen Bereich auch für das Adenokarzinom gilt. Wachstumskurven dieser Art lassen sich in der Regel gut mit der sogenannten Gompertzfunktion beschreiben. Die Volumenwachstumskurve folgt dabei folgender Gleichung:

$$\text{IV: } V_T = V_0 \cdot e^{\frac{A_0}{\alpha} (1 - e^{-\alpha T})}$$

V_0 = Ausgangsvolumen
 V_T = Tumolvolumen nach Wachstumsdauer T
 T = Wachstumsdauer
 A_0 = Wachstumsrate (t^{-1})
 α = Bremskoeffizient (t^{-1})

Dieser Gompertzfunktion liegt der Gedanke zugrunde, daß zu jeder Zeit des Tumorwachstums die Wachstumsgeschwindigkeit exponentiell mit konstanter Bremsrate abnimmt. Bei Annahme einer Wachstumscharakteristik des Resttumors V_D im Sinne einer Gompertzfunktion läßt sich die Dosiswirkungsbeziehung wie folgt errechnen:

$$\text{II: } v_D = v_0 \cdot e^{-\frac{D}{D_0}}$$

$$\frac{D}{D_0} = \ln \frac{v_0}{v_D}$$

$$\text{IV: } v_0 = v_D \cdot e^{\frac{A_D}{\alpha} \cdot (1 - e^{-\alpha \cdot t})}$$

$$\text{V: } A_D = A_0 \cdot e^{\alpha \cdot t}$$

$$\begin{aligned} \text{V in IV: } v_0 &= v_D \cdot e^{\frac{A_0}{\alpha} \cdot (1 - e^{-\alpha \cdot t})} \cdot e^{\alpha \cdot t} = v_D \cdot e^{\frac{A_0}{\alpha} (e^{\alpha \cdot t} - 1)} \\ \ln \frac{v_0}{v_D} &= \frac{A_0}{\alpha} (e^{\alpha \cdot t} - 1) \end{aligned}$$

$$\text{II in IV: } \frac{D}{D_0} = \frac{A_0}{\alpha} (e^{\alpha \cdot t} - 1)$$

$$e^{\alpha \cdot t} = 1 + \frac{D \cdot \alpha}{D_0 \cdot A_0}$$

$$\text{VI: } t = \frac{1}{\alpha} \cdot \ln \left(1 + \frac{D \cdot \alpha}{D_0 \cdot A_0} \right)$$

Bei willkürlicher Festlegung von α auf $0,2 \left[d^{-1} \right]$ und einer Annahme von A_0 auf $\ln 2 / 1,2d = 0,58 \left[d^{-1} \right]$, entsprechend der geschätzten Verdopplungszeit des Adenokarzinoms bei 100 mg, ergibt sich eine Beziehung zwischen verabreichter Dosis, hier verallgemeinernd als Vielfaches der D_0 ausgedrückt, und erzielter Wachstumsverzögerung, die in Gleichung VI bzw. in Abb. 4.3 gezeigt ist. Die Kurve weicht mit steigender Dosis von der linearen Beziehung nach unten ab, d.h. mit jeder Dosissteigerung nimmt die zusätzlich erzielte Wachstumsverzögerung ab. Dies erklärt sich aus der zunehmenden Steigung der Wachstumskurve bei abnehmender Zellzahl.

4.2.4 Experimentelle Dosiswirkungsbeziehung der Wachstumsverzögerung von Fibrosarkom und Adenokarzinom

Bei den beiden untersuchten Tumoren ließ sich bis zu einer Dosis von 20 mg/kg bzw. 15 mg/kg ADR eine annähernd lineare Dosisverzögerungskurve ermitteln, die beim Fibrosarkom erheblich flacher verlief als beim Adenokarzinom, wie Abb. 3.5 und 3.6 zeigen. Höhere Dosen konnten wegen der hohen Toxizität von ADR nicht untersucht werden.

Dieses Verhalten der untersuchten Tumoren legt entsprechend den obigen Überlegungen folgende Vermutungen nahe:

1. Mindestens bis zu einer Dosis von 15 mg/kg ADR fällt die Zellüberlebenskurve beider Tumoren jeweils annähernd exponentiell ab. Die für eine Behandlung mit 20 mg/kg ADR ermittelte überproportionale Verzögerung beim Fibrosarkom ist aufgrund einer deutlich positiven Korrelation von ADR-Letalität und dem Ausmaß individueller Wachstumsverzögerung mit Vorbehalt zu betrachten. Die Wirkungssteigerung erst von einer Dosis von 15 mg/kg an ist auch aus zellulären Überlebenskurven kaum zu erklären. Hingegen kann ausgeschlossen werden, daß jeweils im untersuchten Dosisbereich eine resistente Subpopulation hervortritt. Der Vergleich mit der Zellüberlebenskurve zeigt, daß im Adenokarzinom eine resistente Subpopulation vorliegt, diese jedoch erst bei Dosen von über 15 mg/kg ADR darstellbar wird. Sie ist daher ohne Einfluß auf die Wachstumsverzögerung bis zu dieser Dosis.
2. Unter Annahme einer exponentiellen Inaktivierung macht die lineare Dosiswirkungsbeziehung der Wachs-

tumsverzögerung wahrscheinlich, daß die überlebenden Zellen und ihre Nachkommen im wesentlichen einer exponentiellen Kinetik im Wiederwachstum folgen.

3. Bei Adenokarzinomen, die nach Transplantation von Zellen aus mit 50 mg/kg ADR vorbehandelten Spender-tumoren gewachsen waren, erzielte eine Behandlung mit 15 mg/kg ADR sogar eine größere Wachstumsverzögerung als bei nicht vorbehandelten Adenokarzinomen. Dies schließt eine Selektion resistenter Zellen nach ADR-Behandlung aus.

4.2.5 Vergleich mit der Dosiseffektkurve der Wachstumsverzögerung bei Strahlenbehandlung

Sowohl für das Adenokarzinom 284 (Trott 29)) als auch für das Fibrosarkom AT 24 (Kummermehr (13)) liegen Untersuchungen mit lokaler Strahlenbehandlung vor, wobei die in Abb. 4.4 aufgeführten Wachstumsverzögerungskurven ermittelt wurden. Beide Kurven sind charakterisiert durch einen typischen biphasischen Verlauf. Im Prinzip ähnliche Dosiseffektkurven sind für eine große Anzahl von Experimentaltumoren bekannt geworden (Denekamp (6)). Die regelmäßig beobachtete Konkavität der Kurven nach oben, d.h. eine überproportional zunehmende Verzögerung ist dabei bestimmt durch die dosisabhängige Beeinträchtigung der Proliferationsfähigkeit überlebender Zellen.

Der biphasische Verlauf läßt sich durch die Zusammensetzung der Tumorzellpopulation aus zwei unterschiedlich strahlenempfindlichen Anteilen erklären, die ihre Ursache in der bekannten unzureichenden Sauerstoffversorgung solider Tumoren hat (6). Mit niedrigen Strahlendosen wird zunächst eine empfindliche, aber zahlen-

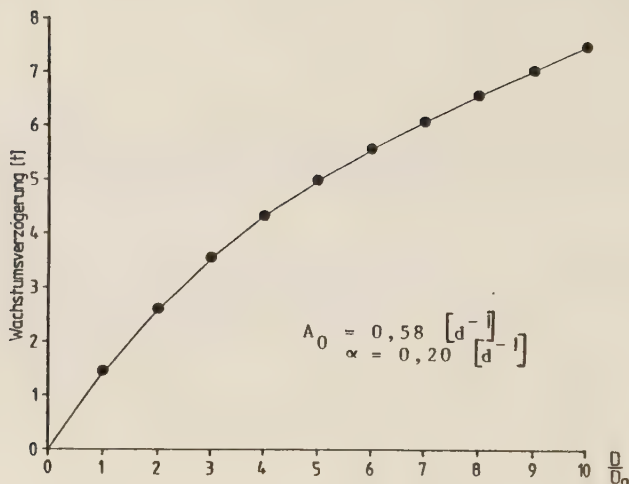


Abb. 4.3: Hypothetische Dosiswirkungskurve bei Annahme eines Rezidiivwachstums nach Gompertz. Aufgetragen ist die Wachstumsverzögerung in Tagen gegen aufsteigende Behandlungsdosen hier verallgemeinernd als Vielfaches der D_0 ausgedrückt.

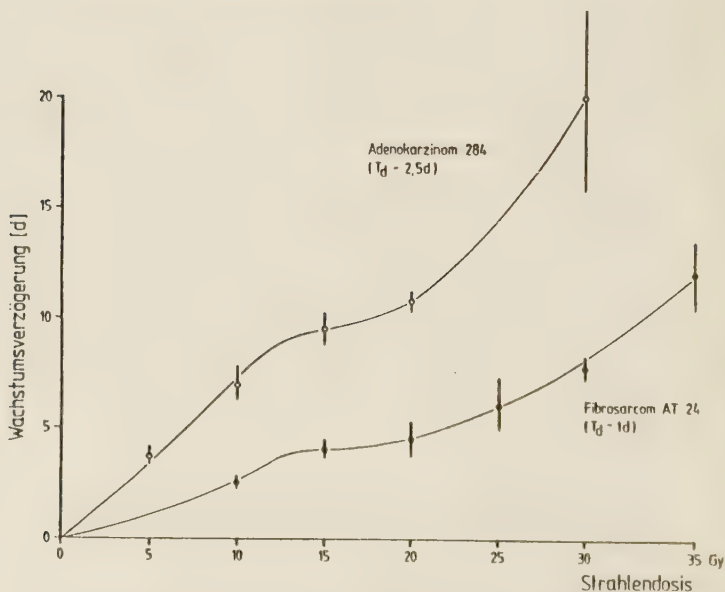


Abb. 4.4: Dosiswirkungskurven bei Strahlenbehandlung: Aufgetragen ist die Wachstumsverzögerung in Tagen gegen aufsteigende Strahlendosen bei
 ● = Fibrosarkom und ○ = Adenokarzinom.

mäßig überlegene Fraktion von gut mit Sauerstoff versorgten Zellen erfaßt, was dem ersten der beiden konkaven Kurvenanteile entspricht. Im höheren Dosisbereich überleben praktisch ausschließlich hypoxische Zellen, wodurch sich der zweite, flacher ansetzende Kurvenanteil erklärt. Oberhalb einer Dosis von 15 Gy bei Adenokarzinom und Fibrosarkom, wenn eine Wachstumsverzögerung von ca. 9 Tagen, bzw. 3 Tagen erreicht ist, wird die Kurve durch die Empfindlichkeit der überlebenden hypoxischen Zellen bestimmt.

Auch bei einer ADR-Behandlung des Adenokarzinoms wird ab einer Dosis von 15 mg/kg für das zelluläre Überleben und somit auch für das Ausmaß der makroskopischen Wachstumsverzögerung die Empfindlichkeit der hypoxischen Zellfraktion entscheidend (Abschn. 4.1.2). Hierbei stimmen die entsprechenden Wachstumsverzögerungen mit 9 d bei Strahlenbehandlung, bzw. ca. 8 d bei ADR-Behandlung, gut überein.

Das Fibrosarkom ist gegen Strahlenbehandlung weniger empfindlich als das Adenokarzinom. So wird schon ab einer Wachstumsverzögerung von 3 Tagen für den weiteren Kurvenverlauf die Empfindlichkeit der hypoxischen Zellen bestimmend. Als noch resistenter erweist sich das Fibrosarkom gegenüber einer Behandlung mit ADR. So erzielt eine hochtoxische Dosis von 20 mg/kg ADR nur eine Wachstumsverzögerung von 2,86 Tagen. Bis zu diesem Dosisbereich ist demnach die ADR-Resistenz des Fibrosarkoms nicht mit der Unempfindlichkeit hypoxischer Zellen erklärbar. Eine gegenüber dem Adenokarzinom geringere Proliferation von Fibrosarkomzellen scheidet als Ursache ebenso aus, da der Markierungsindex mit 37 % beim Fibrosarkom sogar höher liegt als beim Adenokarzinom mit 28 %. Die Unempfindlichkeit des Fibrosarkoms gegenüber ADR scheint vielmehr mit der im Vergleich zum Ade-

nokarzinom äußerst geringen intrazellulären ADR-Aufnahme erklärbar zu sein (siehe Abschn. 4.1.4).

5. Zusammenfassung

An zwei isogenen transplantablen Tumoren der Maus, dem auf dem NMRI-Stamm wachsenden Fibrosarkom AT 24 und dem auf dem C3H-Stamm wachsenden Adenokarzinom 284, wurde die in vivo-Wirkung von Adriamycin (ADR) untersucht. In einer ersten Versuchsreihe wurden die Tiere bei Erreichen einer Tumorgröße zwischen 80 mg und 170 mg mit ADR-Einzeldosen bis zu 20 mg/kg intraperitoneal behandelt. Auf Grund regelmäßiger Größenmessungen wurden therapieinduzierte Wachstumsstörungen, die in Relation zur Überlebensrate der Stammzellen stehen, quantifiziert. Als Maß für die durch ADR ausgelöste Wachstumsverzögerung diente die zum Erreichen der doppelten Behandlungsgröße benötigte zusätzliche Latenzzeit. Bei Behandlung mit Einzeldosen ergab sich bis zu einer Dosis von 15 mg/kg ADR für beide Tumoren eine lineare Dosiswirkungsbeziehung, jedoch mit unterschiedlicher Steilheit; das Fibrosarkom erwies sich im Vergleich zum Adenokarzinom als weitgehend ADR-resistent. Bei fraktionierter Behandlung nahm hier die Wachstumsverzögerung mit Zunahme der Behandlungsintervalle sogar noch ab.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde durch quantitative Transplantation von Tumorzellen die zelluläre Überlebensrate nach Behandlung mit ADR in vivo untersucht. Auch hier erwies sich das Fibrosarkom als relativ resistent. So überlebten bei Exzision des Tumors 24 Stunden nach einer hochtoxischen Dosis von 20 mg/kg ADR 78,5 % der Tumorzellen. Beim empfindlicheren Adenokarzinom ließ sich eine biphasische Zellüberlebenskurve ableiten mit einer initialen D_0 von 3 mg/kg und einer praktisch ADR-resistenten Subpopulation im Tumor von etwa 2 %. Diese Resistenz ist nicht genetisch fixiert, weil Transplantate aus Tumorrezipdiven sogar eine gesteigerte

ADR-Empfindlichkeit aufwiesen. Eine proliferationsspezifische Wirksamkeit von ADR konnte ebenso wenig nachgewiesen werden, da der Anteil der non-growth-fraction nahezu 50 % beträgt. Somit ist mit großer Wahrscheinlichkeit die ADR-resistente Subpopulation mit der hypoxischen Zellfraktion des Tumors in vivo identisch, zumal eine ADR-Resistenz hypoxischer Zellen durch in vitro-Versuche gut belegt ist. Einblicke in die Wachstumscharakteristik überlebender Zellen nach ADR-Behandlung lieferte die Auswertung der Latenzzeiten von tumor takes nach quantitativer Transplantation von Tumorzellen. Erwartungsgemäß sind die zum Erreichen gleicher Latenzzeiten notwendigen Inokulagrößen nach Vorbehandlung der Spendertumoren größer als bei den Kontrollen; ihre Dosisabhängigkeit stimmt zahlenmäßig gut mit der aus den Angehraten ermittelten Zellüberlebenskurve überein. Betrachtet man schließlich innerhalb jeder einzelnen Dosisgruppe (0-50 mg/kg ADR) die Zunahme der Latenzzeit, die sich aus der Verimpfung abnehmender Inokulagrößen (Verdünnungsschritte 1 : 4) ergibt, so ist diese Zunahme weitgehend dosisunabhängig und führt zu einer durchschnittlichen Verdopplungszeit der Zellen von 1,2 - 1,5 Tagen. Diese Betrachtungen legen den Schluß nahe, daß Adenokarzinomzellen, die eine Vorbehandlung mit ADR überlebt haben, in vivo kaum langsamer wachsen als unbehandelte Zellen.

6. Literaturverzeichnis

1. BARRANCO, S.C., GERNER, E.W., BURK, K.H., HUMPHREY, R.M.: Survival and Cell Kinetics Effects of Adriamycin on Mammalian Cells. Cancer Research 33, (1973), 11-16.
2. BERRY, R.J., ANDREWS, J.R.: Quantitative Studies of Radiation Effects on Cell Reproductive Capacity in a Mammalian Transplantable Tumour in vivo. Ann. N. Y. Acad. Sci. 95, (1961), 1001-1008.
3. BONADONNA, G., MONFARDINI, S., DE LENA, M. et al: Clinical evaluation of Adriamycin, a new anti-tumour antibiotic. Br. Med. J. 3, (1969), 503-506.
4. BORN, R., EICHHOLTZ-WIRTH, H.: Effect of different physiological conditions on the action of ADR on Chinese Hamster Cells in vivo. Br. J. Cancer 44, (1981), 241-246.
5. CARTER, S.K.: Adriamycin - A Review. J. Natl. Cancer Inst. 55, (1975), 1265-1274.
6. DENEKAMP, J., HARRIS, S.R.: Tests of Two Electron-Affinic Radiosensitizers in Vivo Using Regrowth of an Experimental Carcinoma. Radiat. Res. 61, (1975), 191-203.
7. DREWINKO, B., GOTTLIEB, J.A.: Survival kinetics of cultured human lymphoma cells exposed to Adriamycin. Cancer Res. 33, (1973), 1141-1145.

8. EICHHOLTZ-WIRTH, H.: Dependence of the cytostatic effect of Adriamycin on drug concentration and exposure time in vitro. *Br. J. Cancer* 41, (1980), 886-891.
9. FINNEY, D.J.: *Statistical Method in Biological Assay*, 2nd. Ed. London: Charles Griffin, (1964).
10. HARRIS, J.R., TIMBERLAKE, N., HENSON, P., SCHIMKE, P., BELLI, J.A.: Adriamycin uptake in V79 and Adriamycin-resistant Chinese Hamster Cells. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 5, (1979), 1235-1240.
11. HEWITT, H.B., WILSON, C.A.: A Survival Curve for Mammalian Leukaemia Cells in vivo. *Br. J. Cancer* 13, (1959), 69-75.
12. HOLLER, E.: Einfluß einer Tumorbettvorbestrahlung auf Wachstum und Proliferationsverhalten des Harding-Passey-Melanoms der Maus. Dissertation, Universität München, (1981).
13. KUMMERMEHR, J., TROTT, K.R.: Sensitization of a transplantable murine fibrosarcoma by partial synchronisation with hydroxyurea. *Radiobiological Research and Radiotherapy*. IAEA, Vienna, Vol. 1, (1977), 426-442.
14. REINHOLD, H.S.: A cell dispersion technique for use in quantitative transplantation studies with solid tumours. *Europ. J. Cancer* 1, (1965), 67-71.
15. REINHOLD, H.S.: *Stralingsgevoeligheid van Tumoren*. Thesis, Rotterdam, (1967).

16. REVESZ, L.: Effect of lethally damaged tumour cells upon the development of admixed viable cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 20, (1958), 1157-1186.
17. SCHLECHTWEG, K.: Zeitfaktoruntersuchung der Strahlenwirkung auf das Harding-Passey-Melanom der Maus. Dissertation, Universität München, (1978).
18. SCHWARTZ, H.S.: A fluorometric assay for Daunomycin and Adriamycin in animal tissues. *Biochem. Med.* 7, (1973), 396-404.
19. SIEMANN, D.W., SUTHERLAND, R.M.: The interaction between Adriamycin and radiation in a solid murine tumor, *Radiat. Res.* 83, (1980), 345-359.
20. SIEMANN, D.W., SUTHERLAND, R.M.: A comparison of the pharmacokinetics of multiple and single dose administrations of Adriamycin. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 5, (1979), 1271-1274.
21. SMITH, E., STRATFORD, I.J., ADAMS, G.E.: Cytotoxicity of Adriamycin on aerobic and hypoxic Chinese Hamster V79 Cells in vitro. *Br. J. Cancer* 41, (1980), 568-573.
22. STEEL, G.G.: Growth Kinetics Of Tumours. Cell Population Kinetics In Relation To The Growth And Treatment Of Cancer. Clarendon Press, Oxford, (1977).
23. STEEL, G.G., ADAMS, E.: Stem-cell survival and tumour control in the Lewis lung carcinoma. *Cancer Res.* 35, (1975), 1530-1535.

24. SUTHERLAND, R.M., EDDY, H.A., BAREHAM, B.,
REICH, K., VANANTWERP, D.: Resistance to
Adriamycin in multicellular spheroids. *Int. J.*
Radiat. Oncol. Biol. Phys. 5, (1979), 1225-1230.
25. SZCZEPANSKI, v.L., TROTT, K.R.: Post-irradiation
kinetics of a serially transplanted murine adeno-
carcinoma. *Br. J. Radiol.* 48, (1975), 200-208.
26. TANNOCK, I.F.: Response of Aerobic and Hypoxic
Cells in a Solid Tumour to Adriamycin and Cyclo-
phosphamide and Interaction of the Drugs with
Radiation. *Cancer Res.* 42, (1982), 4921-4926.
27. THOMLINSON, R.H., CRADDOCK, E.A.: The gross
response of an experimental tumour to single doses
of X-rays. *Br. J. Cancer* 12, (1967), 108-123.
28. TROTT, K.R., HEINZE, H.G., KIESEL, B.,
KOLLMANN, G., KUMMERMEHR, J.: Wachstumsgeschwin-
digkeit von Lungenmetastasen. *Strahlentherapie*
155, (1979), 748-753.
29. TROTT, K.R.: Der Einfluß der Dosisleistung auf die
therapeutische Wirkung von ^{60}Co -Gammastrahlung
beim Adenokarzinom der Maus. *Strahlentherapie* 222,
(1978), 1-6.
30. TWENTYMAN, P.R.: Comparative chemosensitivity of
exponential-versus plateau-phase cells in both in
vitro and in vivo model systems. *Cancer Treat.*
Rep. 60, (1976), 1719

L E B E N S L A U F

Am 10.06.1955 wurde ich als zweites Kind des Lehrerehepaares Helmut und Gertrud Krog, geb. Drickl, in Tegernsee geboren.

Von 1961 bis 1965 besuchte ich die Volksschule in Bad Wiessee und trat dann in das Tegernseer Gymnasium ein, wo ich 1974 mit dem Abitur meine Schulausbildung abschloß.

Im Herbst 1974 begann ich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München mein Studium der Humanmedizin, welches ich 1981 mit dem bestandenen dritten Teil der Ärztlichen Prüfung beendete. Im Mai 1981 erhielt ich die Approbation zum Arzt.

Seit 01.07.1981 bin ich als Assistenzarzt für Anästhesie am Städtischen Krankenhaus in Rosenheim tätig.

